

Massenspektrometrische Erforschung des Proteoms neutrophiler
Granulozyten von Patienten mit ST-Hebungsinfarkt

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Joost Bernd Efken
aus Stuttgart

Gießen 2017

Aus der Arbeitsgruppe Experimentelle Kardiologie
des Franz-Grödel-Instituts
der Kerckhoff-Klinik Bad Nauheim

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. C. Hamm

Gutachter: PD Dr. phil. nat. Christian Troidl

Gutachter: Prof. Dr. Klaus T. Preissner

Tag der Disputation: 23.04.2018

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Physiologie neutrophiler Granulozyten.....	1
1.1.1	Allgemeine Funktionen und Aktivierungskaskade	2
1.1.2	Vergleich der Reaktion auf sterile und unsterile Inflammation	3
1.2	Myokardinfarkt.....	4
1.3	Die Rolle neutrophiler Granulozyten beim Myokardinfarkt.....	5
1.3.1	Entstehung der arteriosklerotischen Plaque	6
1.3.2	Das akute Infarktgeschehen	6
1.3.3	Der Zeitraum nach dem Myokardinfarkt	6
1.4	Proteomik	7
1.4.1	Proteomische Massenspektrometrie	8
1.4.2	Proteomische Analyse von neutrophilen Granulozyten.....	9
1.5	Fragestellung dieser Arbeit	9
2	Materialien	11
2.1	Chemikalien	11
2.2	Verbrauchsmaterialien	12
2.3	Geräte	14
2.4	Softwares	15
2.5	Puffer- und Lösungsprotokolle.....	16
3	Methoden	21
3.1	Probandenkollektiv und Ausschlusskriterien	21
3.2	Schaffung eines sterilen Arbeitsumfeldes	21
3.3	Zellisolation.....	22
3.4	Puritymessung mittels FACS-Analyse.....	25
3.5	Zellstimulation	26
3.6	Aufbereitung der Proben für die Massenspektrometrie	29
3.6.1	Pelletaufbereitung und Coomassie-Färbung.....	30

3.6.2	Tryptischer In-Gel-Proteinverdau	32
3.6.3	Beladung der STAGE-Tips	37
3.7	Massenspektrometrische Analyse	40
3.7.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie.....	40
3.7.2	Elektrospray-Ionisierung.....	41
3.7.3	Full Scan in der Orbitrap	41
3.7.4	Analyse durch kollisionsinduzierte Dissoziation.....	42
3.8	Datenanalyse	42
3.8.1	Auswertung der MS-Daten	42
3.8.2	LFQ-Intensität	42
3.8.3	Statistik	43
3.8.4	Gene Ontology-Analyse	44
3.8.5	Proteom-Analyssetool „GORilla“	45
4	Ergebnisse	46
4.1	FACS-Analyse	46
4.2	Proteomische Analyse neutrophiler Granulozyten von STEMI-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen	47
4.2.1	Regulierte Proteine.....	52
4.2.2	Bei STEMI-Granulozyten erhöht gemessene Proteine	54
4.2.3	Bei STEMI-Granulozyten erniedrigt gemessene Proteine	57
4.3	Proteomische Analyse in vitro stimulierter neutrophiler Granulozyten.....	60
4.3.1	Regulierte Proteine in ATP-stimulierten neutrophilen Granulozyten	63
4.3.2	Regulierte Proteine in LPS-stimulierten neutrophilen Granulozyten.....	66
4.3.3	Regulierte Proteine in ATP/ LPS-stimulierten neutrophilen Granulozyten	71
4.3.4	Bezug der Ergebnisse aller drei Experimente aufeinander	75
5	Diskussion.....	77
5.1	Methode.....	78
5.1.1	Zeitpunkt der Probengewinnung bei STEMI-Patienten	78
5.1.2	Methodisches Vorgehen, Patienten- und Probandenkollektiv	78
5.1.3	Neutrophile Granulozyten als Fokus dieser Arbeit.....	80
5.1.4	Proteine als Fokus dieser Arbeit	80
5.1.5	Massenspektrometrie.....	81
5.2	Proteomverteilung auf die Zellkompartimente	81

5.3	Proteomische Analyse neutrophiler Granulozyten von STEMI-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen.....	84
5.3.1	Proteomprofil	84
5.3.2	Biologische Prozesse.....	85
5.4	Proteomische Analyse in vitro stimulierter neutrophiler Granulozyten.....	90
5.4.1	ATP-Stimulation	90
5.4.2	LPS-Stimulation.....	91
5.4.3	ATP/ LPS-Kombinationsstimulation.....	92
5.4.4	Bezug gesamtproteomischer Veränderungen der in vitro-Versuche.....	92
5.5	Vergleich der sterilen und septischen Inflammationsreaktion neutrophiler Granulozyten	93
5.6	Vergleich der Ergebnisse der in vivo- und in vitro-Versuche.....	97
5.7	Klinischer Bezug	98
6	Zusammenfassung.....	101
7	Summary	102
8	Abkürzungsverzeichnis.....	103
9	Abbildungsverzeichnis.....	106
10	Tabellenverzeichnis.....	109
11	Literaturverzeichnis.....	110
12	Erklärung zur Dissertation	117
13	Danksagungen	118

1 Einleitung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Proteom neutrophiler Granulozyten unter verschiedenen Bedingungen untersucht.

1.1 Physiologie neutrophiler Granulozyten

Neutrophile Granulozyten bilden 50-70 % der im menschlichen Blut zirkulierenden Leukozyten und stellen somit die mit Abstand größte Subpopulation der weißen Blutkörperchen dar (Kolaczowska and Kubes 2013). Der Körper produziert im Schnitt $1-2 \times 10^{11}$ Granulozyten täglich (Borregaard 2010), welche eine durchschnittliche Lebenszeit von 5,4 Tagen haben. Sie haben einen Durchmesser von 7–10 μm (Kolaczowska and Kubes 2013).

Neutrophile Granulozyten entstehen im Knochenmark im Zuge der Hämatopoese aus myeloischen Progenitorzellen. Die verschiedenen Entwicklungsstufen werden als Myeloblast, Promyelozyt, Myelozyt, Metamyelozyt, Stabkerniger Granulozyt und Segmentkerniger Granulozyt (entwickelter neutrophiler Granulozyt) bezeichnet (Kolaczowska and Kubes 2013).

Der Einfluss des Transkriptionsfaktors PU.1 induziert bei Vorläuferzellen die myeloische Zellreihe und diese differenzieren sich unter Einfluss von C/EBP α und Gfi-1 zu neutrophilen Granulozyten. Schließlich entscheidet das Gleichgewicht zwischen CXCR4 (Verbleib im Knochenmark) und CXCR2 (Ausschwemmung ins Blut) und ihrer Liganden über die Rate der ins Blutsystem entlassenen neutrophilen Granulozyten (Borregaard 2010).

Der Granulozyten-Kolonie stimulierende Faktor (G-CSF, für engl. Granulocyte-Colony Stimulating Factor) ist der wichtigste Regulator der Granulopoese. Durch seinen Einfluss schlagen Progenitorzellen den Weg in die myeloische Zellreihe ein, die Vermehrung von Granulozyten-Vorläuferzellen wird stimuliert und reife Granulozyten werden aus dem Knochenmark ausgeschwemmt. Somit wird durch G-CSF die Granulopoese auf allen Ebenen stimuliert (Summers et al. 2010).

1.1.1 Allgemeine Funktionen und Aktivierungskaskade

Neutrophile Granulozyten sind Zellen des angeborenen Immunsystems, deren Hauptaufgabe in der Abwehr pathogener Keime liegt.

Signalstoffe bewirken im Endothel die vermehrte Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle (z.B. P-Selectine, E-Selectine und verschiedene Integrine) auf der luminalen Oberfläche. Zu diesen Signalstoffen gehören zum einen PAMPs (für engl. pathogen associated molecular patterns; dt. pathogen-assoziierte molekulare Muster) wie zum Beispiel bakterielle Lipopolysaccharide (LPS). Zum anderen dienen sogenannte DAMPs (für engl. damage/ danger associated molecular patterns; dt. Zerstörung/ Gefahr-assoziierte molekulare Muster) als Signalstoffe. Dazu gehören beispielsweise körpereigene Zytokine (z.B. Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-17 (IL-17)) und freies Adenosintriphosphat (ATP), welches bei Zellnekrose freigesetzt wird (Zhang et al. 2010).

PAMPs und DAMPs werden durch die Liganden zirkulierender neutrophiler Granulozyten (hauptsächlich P-Selectin Glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) und L-Selectin (SELL)) gebunden, wodurch eine Aktivierungskaskade initiiert wird (Abbildung 1). Diese beginnt mit dem sogenannten Rolling. Dabei „rollt“ der neutrophile Granulozyt durch temporäre Bindungen zwischen endothelialen Adhäsionsmolekülen und granulozytären Liganden am Gefäßlumen entlang (Amulic et al. 2012).

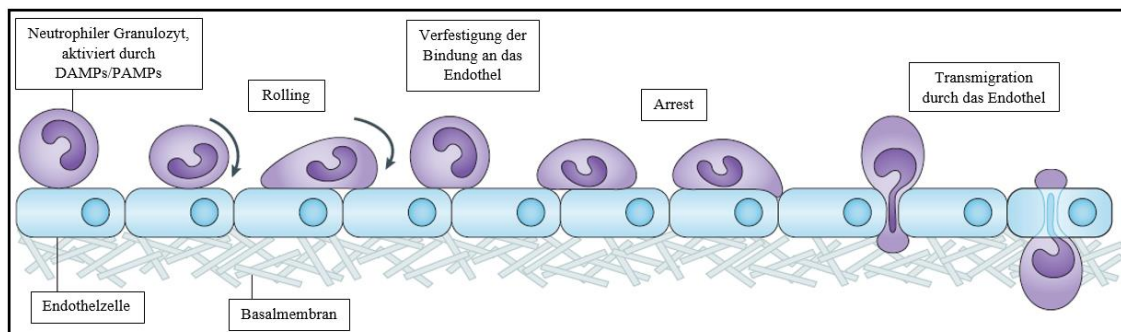


Abbildung 1 Aktivierungskaskade neutrophiler Granulozyten (verändert nach (Ley et al. 2007))

Es folgt die feste Bindung der neutrophilen Granulozyten an das Endothel, vermittelt durch die Interaktion granulozytärer Integrine (z.B. LFA1, VLA4 und $\alpha 4\beta 7$ -integrin) mit endothelialen Proteinen (z.B. ICAM1, VCAM1 und MADCAM-1). Im folgenden Schritt transmigrieren die neutrophilen Granulozyten durch das Endothel, um in das entzündete Zielgewebe einzuwandern (Ley et al. 2007).

Dort stehen ihnen mehrere Mechanismen der Inflamationsreaktion bzw. Immunabwehr zur Verfügung. An erster Stelle zu nennen sind die namensgebenden Granula, welche in

drei Klassen unterteilt werden können: Azurophile, spezifische und Gelatinasegranula. Mit ihnen werden hochpotente, aggressive Substanzen der Immunabwehr transportiert und können gezielt ausgeschüttet werden. Außerdem produzieren sie eine große Anzahl antimikrobieller Proteine. Dazugehören beispielsweise die Myeloperoxidase, das Lysozym und das bakterien-permeabilisierende Protein (Amulic et al. 2012).

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS, für engl. reactive oxygen species), die im Zuge des sogenannten „oxidativen Bursts“ bei der Immunreaktion ausgeschüttet werden, stellen einen weiteren Abwehrmechanismus dar. Es handelt sich dabei um chemisch aggressive Substanzen zur Bekämpfung schädigender Strukturen. Außerdem sind neutrophile Granulozyten zur Phagozytose fähig, wodurch Pathogene und Zelltrümmer unschädlich gemacht und entsorgt werden können. Zuletzt ist noch der Mechanismus der neutrophilen extrazellulären Fallen (NETs, vgl. engl. neutrophil extracellular traps) zu nennen. Dies sind Strukturen, die aus dekondensiertem Chromatin und daran gebundenen antimikrobiellen Substanzen bestehen. Sie können unter eigener Apoptose („NETose“) exozytiert werden und setzen Pathogene sehr hohen Konzentrationen antimikrobieller Substanzen aus und bilden eine physikalische Barriere (Amulic et al. 2012).

Bei der Erforschung der pathophysiologischen Rolle neutrophiler Granulozyten und ihrer Aktivierungskaskade gewinnen Inflammasome zunehmend an Bedeutung. Dies sind zytosolische Protein-Makrokomplexe, die in neutrophilen Granulozyten zu finden sind. Unter anderem werden Inflammasome durch die Kombination aus PAMPs (wie zum Beispiel LPS) und DAMPs (wie zum Beispiel ATP) aktiviert. Durch diese Aktivierung werden proinflammatorische Zytokine, hauptsächlich IL-1 β und Interleukin-18 (IL-18), freigesetzt. IL-1 β und IL-18 ihrerseits induzieren eine Reihe von Prozessen im Rahmen der Inflammasreaktion und der neutrophilen Aktivierungskaskade (Bauernfeind et al. 2011).

1.1.2 Vergleich der Reaktion auf sterile und unsterile Inflammation

Klassischerweise übernehmen neutrophile Granulozyten vielfältige Aufgaben bei der Abwehr septischer Pathogene, wie zum Beispiel Bakterien. Zunehmend von Interesse ist auch die Reaktion neutrophiler Granulozyten auf die sterile Entzündung, wie sie zum Beispiel durch eine myokardiale Ischämie induziert wird (Chen and Nuñez 2010). Unklar ist, in welchem Maße neutrophile Granulozyten auf septische und sterile Stimuli mit verschiedenen zellpathophysiologischen Mechanismen reagieren können (Kolaczowska

and Kubes 2013). Oft binden sowohl PAMPs als auch DAMPSs an die gleichen Rezeptoren auf neutrophilen Granulozyten und induzieren gleiche Immunabwehrkaskaden (McDonald et al. 2010). Andererseits wurden Rezeptoren gefunden, welche je nach Ligand unterschiedliche Immunantworten induzieren. Der Formylpeptidrezeptor beispielsweise triggert je nach Ligand und Zelltyp pro- oder antiinflammatorische Immunantworten in neutrophilen Granulozyten (Ye et al. 2009). Auch wurde der CD24-Siglec-Stoffwechselweg (Siglec, für engl. Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins; dt. Sialinsäure-bindende Immunglobulin-ähnliche Lectine) identifiziert, durch welchen die Immunantwort unter Einfluss von DAMPs selektiv unterdrückt wurde, während dies unter Einfluss von PAMPs nicht der Fall war. Diese Ergebnisse legen nahe, dass neutrophile Granulozyten zwischen septischen und sterilen Inflammationszuständen unterscheiden können und ihnen auf den jeweiligen Inflammationstyp spezialisierte Reaktionsmechanismen zur Verfügung stehen (Liu et al. 2009).

Bei der Immunantwort auf septische Pathogene ist der Nutzen durch neutrophile Granulozyten zweifelsfrei bewiesen (Amulic et al. 2012). Bei der sterilen Inflammation ist dies nicht der Fall. So wurde sowohl ein protektiver Effekt als auch eine destruktive und somit schädliche Komponente nachgewiesen. Es werden durch neutrophile Granulozyten einerseits wichtige Funktionen, wie zum Beispiel die Wiederherstellung von Gewebe, übernommen (Chen and Nuñez 2010). Andererseits kommt es durch die Produktion von ROS zu einer vermehrten Gewebsdestruktion. Unklar ist, welcher dieser beiden Effekte unterm Strich überwiegt und ob neutrophile Granulozyten somit insgesamt einen positiven oder einen negativen Einfluss auf das Outcome bei Erkrankungen haben, welche mit einer sterilen Inflammationsreaktion einhergehen (Carbone et al. 2013).

1.2 Myokardinfarkt

Der Myokardinfarkt zählt zu den bedeutendsten Krankheitsereignissen in den Industrienationen. Das Statistische Bundesamt gibt für das Jahr 2015 eine Anzahl von mehr als 49.210 Verstorbenen mit der Diagnose „Akuter Myokardinfarkt“ an. Damit gilt dieser weiterhin als Haupttodesursache in Deutschland mit großer gesellschaftlicher und ökonomischer Bedeutung (Statistisches Bundesamt 2015).

Überbegriff aller temporären oder permanenten ischämischen Ereignisse des Herzmuskels ist das akute Koronarsyndrom (ACS, für engl. acute coronary syndrome). Diese Arbeit befasst sich mit der Pathophysiologie vor allem des ST-Hebungsinfarktes (STEMI,

für engl. ST-elevation myocardial infarction). Per definitionem handelt es sich dabei um eine Myokardischämie mit dem Korrelat einer ST-Streckenhebung im Elektrokardiogramm (EKG). Das klinische Krankheitsbild ist meistens hoch akut und bedarf schnellstmöglicher Behandlung (Deckers 2013).

Die zweite Entität ist der Nicht-ST-Hebungsinfarkt (NSTEMI, für engl. non ST-segment elevation myocardial infarction). Bei diesem tritt keine ST-Elevation im EKG auf. Das klinische Bild ist heterogener als das des STEMI und insgesamt ist das Ereignis weniger akut (Deckers 2013).

An dritter Stelle ist die instabile Angina Pectoris zu erwähnen, bei der es noch nicht zu einer absoluten Ischämie, wohl aber zur zeitweise ungenügenden Sauerstoffversorgung eines Myokardareals kommt. Sie ist eine Vorstufe des Myokardinfarkts und geht mit dem STEMI/ NSTEMI ähnlichen klinischen Symptomen einher, die aber zeitlich begrenzt sind. Die Gefahr, einen STEMI/ NSTEMI zu erleiden, ist bei Patienten mit einer instabilen Angina Pectoris sehr hoch (Braunwald 1989).

Die Grundlage der meisten myokardialen ischämischen Ereignisse ist Koronararteriosklerose, die bei Progression zur Koronaren Herzkrankheit (KHK) führt. Gefördert durch Risikofaktoren und genetische Prädisposition bilden sich arteriosklerotische Plaques an den Koronararterienwänden. Nach langjähriger Entwicklung der Arteriosklerose kann eine sogenannte vulnerable Plaque entstehen, welche instabil wird und rupturiert. Dabei reißt die bindegewebige Hülle der Plaque ein und der lipidreiche Kern wird freigelegt. Dies initiiert eine heftige Immunreaktion. Auf der freigelegten Stelle lagern sich neben verschiedenen Zellen des Immunsystems vor allem Thrombozyten an. Darunter kommt es zum weiteren bindegewebigen Umbau der Plaque. Unter diesem Prozess verengt sich das Lumen der Koronararterie immer weiter, bis es schließlich zur kompletten Okklusion mit Ischämie des Versorgungsgebietes kommt (Davies 2000).

1.3 Die Rolle neutrophiler Granulozyten beim Myokardinfarkt

Nach heutigem Stand der Wissenschaft spielen neutrophile Granulozyten in allen Phasen der Pathogenese des Myokardinfarktes eine Rolle. Trotzdem ist insgesamt zu bemerken, dass ihre genaue Funktion dabei weitestgehend ungeklärt bleibt.

1.3.1 Entstehung der arteriosklerotischen Plaque

Lange konnte man neutrophile Granulozyten in arteriosklerotischen Plaques nicht detektieren und sprach ihnen so eine untergeordnete Rolle bei deren Entstehung zu. Arbeiten, die einen möglichen Zusammenhang in experimentellen Tiermodellen noch einmal näher untersucht haben, weisen aber nun darauf hin, dass neutrophile Granulozyten an arteriosklerotischen Plaques akkumulieren. Dies macht einen pathogenetischen Zusammenhang wahrscheinlich. Die Hypothese konnte durch klinische Untersuchungen unterstützt werden. Diese wiesen nach, dass eine erhöhte Zellzahl an neutrophilen Granulozyten im Blut mit dem Vorhandensein und der Schwere einer KHK korreliert. Unklar ist weiterhin, ob neutrophile Granulozyten für die Entstehung arteriosklerotischer Plaques verantwortlich sind, oder ob sie lediglich reaktiv systemisch und lokal in ihrer Konzentration ansteigen (Carbone et al. 2013).

1.3.2 Das akute Infarktgeschehen

Auch beim akuten Infarktgeschehen spielen neutrophile Granulozyten eine wichtige Rolle. Eine vulnerable Plaque stellt ein inflammatorisch aktives Milieu dar, welches neutrophile Granulozyten chemotaktisch anlockt und diese aktiviert. Wie bereits erläutert, enthalten neutrophile Granulozyten Proteasen, radikale Sauerstoffspezies und viele weitere gewebeschädigende Substanzen. In verschiedenen experimentellen Studien konnten fibrolytische Effekte einiger dieser Substanzen, darunter zum Beispiel der Myeloperoxidase und verschiedener Metalloproteinasen, nachgewiesen werden. Diese Stoffe werden im Rahmen der Inflammation freigesetzt. So ist davon auszugehen, dass neutrophile Granulozyten auf diese Art und Weise zur Ruptur der bindegewebigen Kapsel einer vulnerablen Plaque beitragen. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass sie auch zur Progression des nekrotischen Kerns einer Plaque beitragen, indem sie einwandern und in die Apoptose gehen. Möglicherweise trägt dieser Prozess zur weiteren Instabilisierung einer Plaque bei (Soehnlein 2012).

1.3.3 Der Zeitraum nach dem Myokardinfarkt

Auch in der Phase nach dem Myokardinfarkt kann man quantitative Veränderungen der Granulozytenkonzentration verzeichnen (Yan et al. 2013). Vorweg ist zu erwähnen, dass Patienten nach STEMI heutzutage in fast allen Fällen durch eine PCI (für engl. Percutaneous coronary intervention; dt. Perkutane Koronarintervention) behandelt werden, was

bei der Interpretation von Studienergebnissen mitberücksichtigt werden sollte. Im Tierexperiment kann dieser Faktor ausgeschaltet werden.

Granulozyten sind ein maßgeblicher Akteur der postischämischen Phase (Carbone et al. 2013). So wurde in Studien bei Mäusen ein Myokardinfarkt experimentell induziert und infarziertes Gewebe aus den später isolierten Herzen untersucht. Man fand dort einen stetigen absoluten Anstieg der Granulozyten mit einem Höhepunkt an Tag drei nach Infarkt. Anschließend fiel die Anzahl wieder (Yan et al. 2013).

Ebenfalls wurde das Blut von Patienten untersucht, die mit der Diagnose STEMI ins Herzkatheterlabor aufgenommen wurden. Man fand heraus, dass die bei Aufnahme gemessene Blutgranulozytenkonzentration mit der später diagnostizierten Infarktgröße positiv korreliert (Avanzas et al. 2004).

Unsere Arbeitsgruppe untersuchte die Kinetik neutrophiler Granulozyten, nachdem bei Patienten eine transkoronare Ablation der Septumhypertrophie (TASH) durchgeführt wurde. Die TASH imitiert einen Myokardinfarkt im klinischen Setting, wodurch jeglichen Messungen genaue Zeitpunkte nach dem Infarktgeschehen zugeordnet werden können. Außerdem können alle Targets vor dem Eingriff gemessen und somit ein patienten-individueller Basiswert bestimmt werden. Wir konnten zeigen, dass bereits 15 Minuten nach der TASH die Zellzahl neutrophiler Granulozyten im Blut anstieg und bereits nach zwei Stunden der Anstieg gegenüber dem Basiswert (vor TASH) signifikant war (Liebtrau et al. 2015).

Carbone et al. schildern in ihrer Übersichtsarbeit, dass weitestgehend unklar ist, wie der Effekt neutrophiler Granulozyten auf infarziertes Myokard insgesamt zu bewerten ist. Einerseits fördern sie den Heilungsprozess durch die Ausschüttung antiinflammatorischer Moleküle. Andere Faktoren wiederum wirken sich schädlich auf den Herzmuskel aus. Die Schädigung geschieht zwar vor allem durch die Rekrutierung inflammatorischer Monozyten, aber auch der Einfluss durch ROS und proteolytische Substanzen neutrophiler Granulozyten schaden dem infarzierten Gewebe (Carbone et al. 2013).

1.4 Proteomik

„Im Gegensatz zu anderen Worten, die die Welt veränderten – z.B. Gleichheit oder soziale Gerechtigkeit – ist das Wort Proteom eindeutig definiert. Man versteht darunter die Gesamtheit der Proteine einer Zelle, eines Gewebes oder eines Organismus, nach Zahl

und Konzentration, zu einem bestimmten Zeitpunkt und bestimmten Bedingungen.“ (Rehm and Letzel 2010).

Das wissenschaftliche Feld der Proteomik befasst sich damit, das Gesamtproteom einer zu analysierenden Probe möglichst genau und vollständig zu detektieren. Zur Verfolgung dieses Ziels spielt die Massenspektrometrie die größte Rolle. Immer bessere massenspektrometrische Verfahren, gekoppelt mit großen Proteindatenbanken, erlauben die Erfassung einer großen Anzahl verschiedener Proteine in wenigen Messdurchläufen (Rehm and Letzel 2010).

1.4.1 Proteomische Massenspektrometrie

Es gibt verschiedene Ansätze der massenspektrometrischen Analyse von Proteinen. Oft wird die zu analysierende Probe zunächst enzymatisch verdaut. Dies wird durchgeführt, da die resultierenden Peptide aufgrund ihrer geringeren Masse im Massenspektrometer besser messbar sind. Als Proteasen werden überwiegend Trypsin und Lysozyme C (Lys-C) verwendet. Die Verdauungsprodukte werden anschließend im Massenspektrometer analysiert (Rehm and Letzel 2010).

Auch wenn sich die einzelnen Geräte und Verfahren unterscheiden, folgen alle Massenspektrometer den gleichen prinzipiellen Grundsätzen in ihrer Funktionsweise. Die drei essenziellen Bausteine sind die Ionenquelle, der Analysator und der Detektor. In der Ionenquelle wird die zu analysierende Probe ionisiert, in die Gasphase konvertiert und die Ionen durch ein elektromagnetisches Feld beschleunigt. Der Analysator trennt anschließend die Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) auf, wodurch sie voneinander unterscheidbar werden. Im Detektor werden die verschiedenen Ionen je nach ihrer Masse und Ladung erfasst und somit gemessen. Nachgeschaltet ist eine bioinformatische Software, welche die Daten auswertet und anhand von Datenbanken den gemessenen Ionen Peptide zuordnet. Da die Peptidmassen und die zugehörigen Ladungen sehr spezifisch für die Ursprungsproteine sind, kann anhand dieser Informationen auf ursprünglich in der Probe enthaltene Proteine geschlossen werden (McLeish et al. 2013).

Für weitere Informationen bezüglich der Funktionsweise und des Messprinzips von Massenspektrometern wird auf den entsprechenden Abschnitt im Kapitel Material und Methoden verwiesen (Kapitel 3.7).

1.4.2 Proteomische Analyse von neutrophilen Granulozyten

Im Allgemeinen werden drei Ansätze in der Proteomik beschrieben: Die Expressionsproteomik ist das bisher am weitesten erforschte Teilgebiet. Mit ihr wird versucht, das zu einem bestimmten Zeitpunkt vorhandene Proteom einer gewonnenen Probe möglichst komplett darzustellen – sie untersucht Art und Quantität der Proteine. Die strukturelle Proteomik beschreibt kompliziertere Proteinkomplexe und Interaktionen zwischen Proteinen. Als dritter Ansatz befasst sich die funktionelle Proteomik mit posttranslationalen Modifikationen von Proteinen, wie z.B. Phosphorylierungen oder Alkylierungen, die meistens regulatorische Effekte haben (Luerman et al. 2010).

Obgleich sich viele Projekte bereits mit der Erforschung des granulozytären Proteoms unter verschiedenen Bedingungen und auf Expressions-, struktureller und funktioneller Ebene beschäftigt haben, bedarf es noch weiterer Forschung, um es als systembiologisches, dynamisches Netzwerk weiter verstehen und (z.B. zum besseren Verständnis von Erkrankungen im kardiovaskulären Bereich) nutzen zu können (McLeish et al. 2013).

Als Beispiele proteomischer Arbeiten zur klinischen Relevanz neutrophiler Granulozyten können die Analysen von Ramos-Mozo et al. (2011) und Zhou et al. (2013) genannt werden. Ramos-Mozo et al. (2011) identifizierten in neutrophilen Granulozyten exprimierte Catalase als einen potentiellen Biomarker für abdominelle Aortenaneurysmen. Zhou et al. (2013) untersuchten das Proteom neutrophiler Granulozyten bei Trauma-Patienten und identifizierten bisher noch nicht in diesem Zusammenhang beschriebene Proteinalterationen (Ramos-Mozo et al. 2011; Zhou et al. 2013).

1.5 Fragestellung dieser Arbeit

Neutrophile Granulozyten spielen eine maßgebliche Rolle bei der Pathogenese des Myokardinfarktes und im Rahmen des akuten Infarktgeschehens (Carbone et al. 2013). Der explorative Ansatz der vorliegenden Arbeit besteht darin, das Proteom neutrophiler Granulozyten von STEMI-Patienten mit dem gesunder Kontrollen zu vergleichen. So soll auf expressionsproteomischer Ebene das Verständnis der bisher unvollständig geklärten Rolle neutrophiler Granulozyten beim Myokardinfarkt verbessert und im weiteren Schritt Ansätze für mögliche pharmakologische Interventionen in der Therapie eröffnet werden. Des Weiteren wurden neutrophile Granulozyten in der Zellkultur verschiedenen Stimuli ausgesetzt. Als Stimulanz wurde zum einen LPS gewählt als klassischer Induktor einer Reaktion auf einen unsterilen Reiz, wie er zum Beispiel bei der Abwehr von bakteriellen

Pathogenen vorliegt. Zum anderen wurde ATP gewählt, welches aus nekrotischen Zellen (beispielsweise Kardiomyozyten) freigesetzt wird und eine sterile Inflamationsreaktion hervorruft, wie sie beim Myokardinfarkt vorliegt. Durch die Analyse des Proteoms dieser in der Zellkultur stimulierten neutrophilen Granulozyten sollen Aussagen über verschiedenartige pathophysiologische Mechanismen bei der Immunantwort gegenüber der sterilen und der unsterilen Inflammation gemacht werden können.

Schlussendlich soll der Vergleich beider Ansätze hergestellt werden. Somit soll auch geprüft werden, inwiefern die bei der Zellkultur experimentell induzierte Reaktion der neutrophilen Granulozyten mit jener im klinischen Setting beim STEMI übereinstimmt.

2 Materialien

Im Folgenden sind alle Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Geräte und Softwares aufgelistet, die für die Versuche und Analysen benutzt wurden.

2.1 Chemikalien

Produktbezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
ABC (Ammoniumbicarbonate)	Sigma	A6141-500g
ACN Acetonitril	Sigma	34851-1l
AK 426 - PerCP/ Cy5.5 anti human CD66b 100 tests	Biolegend	305108
AK407 - Alexa Fluor700 anti human CD11b	Biolegend	557918
AK450 - Alexa Fluor488 anti humanCD14	Biolegend	301811
Aqua B. Braun	B. Braun	0082423E
Aqua B. Braun	B. Braun	0082423E
ATP NLRP3 inflammasome Inducer	InvivoGen	tlrl-atp
BD FACS Sheath Solution with Surfactant 20l	BD	336911
BD FACS Clean Solution 5l	BD	340345
BD FACS Rinse Solution 5l	BD	340346
BD Pharm Lyse	BD	555899
Bradford Biorad DC Protein Assay Reagent A	BioRAD	500-0113
Bradford BioRAD DC Protein Assay Reagent B	BioRAD	500-0114
BSA 2 mg/ml	Sigma	P0834
C18-AQ ReproSil-Pur, 3 µm	Dr. Maisch GmbH	
Colloidale Blue Staining Kit	Invitrogen	LC6025
Dextran, from Leuconostoc spp.	Sigma-Aldrich	31392-50g
DTT	Sigma	D9779-5G
Dulbecco's PBS (10x)	c.c.pro	PL-21-L
Empore SPE Disks Octadecyl C18 20 St.	Supelco (Sigma)	66883-U
Essigsäure 100 %	Roth	6755.1
Essigsäure 100 % für die HPLC	Appli Chem	A2354,0500
Ethanol absolut	Merck	1009831000

Foetales Kälberserum	c.c.pro	S-10-L
Histopaque 1077, 500 ml	Sigma-Aldrich	10771
Iodacetamid	Sigma	I6125-10g
L-Glutamin	c.c.pro	Z-10-M
LPS-EB Ultrapure	InvivoGen	tlrl-3pelps
Methanol für die HPLC	Appli Chem	A1635,1000
Methanol reinst.	Roth	CP43.3
NaCl für Dextran	B. Braun	3570160
Natriumhydroxid	Roth	P031.2
NuPage 4malLDS	Invitrogen	NP0007
NuPage Antioxidant 15 ml	Invitrogen	NP0005
NuPage MOPS SDS Running Buffer	Invitrogen	NP0001
Penicillin-Streptomycin	c.c.pro	Z-13-M
Quiazol Lysis Reagent	Quiagen	79306
ROTIPURAN 2-Propanol	Carl Roth	6752.2
RPMI 1640	c.c.pro	FM-16-L
Salzsäure rauchend 37 %	Carl Roth	4625.1
SDS / Natriumlaurylsulfat	Carl Roth	4360.1
SeeBlue Plus 2 Pre-Stained-Standard	Invitrogen	LC5925
TFA	Sigma	T6508-5ML
Tris Ultra Qualität	Roth	5429.1
Trypan Blue solution	Sigma-Aldrich	T8154
Trypsin	Promega	V5113

Tabelle 1 Liste aller verwendeten Chemikalien, Lösungen, Antikörper und Kits

2.2 Verbrauchsmaterialien

Produktbezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
6 well culture plate	Greiner bio-one	657160
BD Falcon, 5 ml, Polystyrene, Round Bottom Tube	BD	352058
Microplates Flat Bottom	Greiner bio one	655101

Minisart® NML	sartorius stedim	16534----- ----K
MultiFlex Tip, Round (0.57mm O.D.), Bulk	Sorenson BioScience, Inc.	28480
NuPAGE Novex 4-12 % Bis-Tris Gels, 1,0mm	Invitrogen	NP0321
Pasteurpipetten	Carl Roth	4522
Pipette, mit Spitze, 10 ml	Greiner Bio-One	607180
Pipette, mit Spitze, 25 ml	Greiner Bio-One	760180
Pipette, mit Spitze, 50 ml	Greiner Bio-One	768180
Pipette, mit Spitze, 5 ml	Greiner Bio-One	606180
Pipettenspitzen MultiGuard, 50-1250 ml	Sorenson BioScience	34000
Pipettenspitzen SafeGuard, 1-100 ml	Peqlab	811012
Pipettenspitzen SafeSeal, 10 ml	Biozym	770020
PP-Röhrchen, 15 ml	Greiner Bio-One	188271
PP-Röhrchen, 50 ml	Greiner Bio-One	227261
Research Plus Pipette, 1000 ml	Eppendorf	312000006 2
Research Plus Pipette, 100 ml	Eppendorf	312000004 6
Research Plus Pipette, 10 ml	Eppendorf	312000002 0
Research Plus Pipette, 200 ml	Eppendorf	312000005 4
Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf	30120.086
Safe-Lock Tubes 2,0 ml	Eppendorf	30120.094
Skalpell	B. Braun	BA 218
S-Monovette	Sarstedt	11605001
Spritze 10 ml/ Luer Solo	B. Braun	4606108V

Tabelle 2 Liste aller verwendeten laboratorischen Verbrauchsmaterialien

2.3 Geräte

Gerät	Hersteller	Produktbezeichnung/ Seriennummer
Analysewaage	Kern	ALJ 160-4NM
Autoclav	Systec GmbH	VX-95
Bakterienbank	Clean Air Deutschland GmbH	DCF / BSS4, NSF49
CCD-Imagersystem	BioRAD	ChemiDoc XRS
Durchflusszytometer	BD	LSR II Flow Cytometer
Feinwaage	Kern & Sohn GmbH	ALJ 160-4NM
Photometer FLUOstar Galaxy	BMG Labtech	20269
Gelelektrophoresekammer	Invitrogen	XCell SureLock® Mini-Cell
Große Eppendorf-Zentrifuge	Eppendorf	Centrifuge 5810R
HPLC	Agilent	LC 1200 Series
HPLC	Proxeon	LC EASY-nLC
Kleine Eppendorf-Zentrifuge	Eppendorf	Centrifuge 5430R
Kleine Heraeus-Zentrifuge	Heraeus	Fresco 17 Centrifuge
Kühlzelle	Viessmann	472346
Lichtmikroskop	Zeiss	Axiovert 100TV
Lichtmikroskop	Leica Microsystems GmbH	DM 1000 LED
Massenspektrometer Orbitrap	Thermo Scientific	LTQ Orbitrap XL
Massenspektrometer Orbitrap Velos	Thermo Scientific	LTQ Orbitrap Velos
Objektträger	Menzel GmbH	Menzel-Superfrost
pH-Meter	Nova Analytics Corp.	pH 526
Pipettierhilfe	Integra Biosciences	Pipetboy acu 155000
Sauger	KNF	N 035.1.2 AN.18
Schüttler	Grant-bio	PMS-1000
Sonifiziergerät	Branson	Sonifier 250

Spannungsquelle	Invitrogen	PowerEase® 500 Power Supply
Speed Vac	Eppendorf	Concentrator plus
Spülmaschine	Miele & Cie. KG	Mielabor G7783
Sterilbank	Erlab D.F.S S.A.S	Biocap DNA/RNA
Sterilisator	Heraeus Holding GmbH	T6060
Thermomixer compact	Eppendorf	5350 00783
Vortexer	Heidolph	REAX 2000
Wärmeschrank	New Brunswick Scientific	Innova 4200 Incubator-Shaker
Wasserbad	GFL	1003

Tabelle 3 Liste aller verwendeten Geräte

2.4 Softwares

Software	Hersteller
BD FACSDiva Version 6.1.3	BD Biosciences, San Jose, USA
Fluostar Fluo32	BMG Labtechnologies
GraphPad Prism Version 5.03	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA 92037 USA
Gene Ontology enRIchment anaLysis and visuaLizAtion tool "GORilla"	
Imager-Software QuantityOne, Version 4.6.5	BioRad Laboratories GmbH, München
MaxQuant Version 1.5.3.30	Computational Systems Biochemistry, max planck institute of biochemistry, Munich, Prof. Jürgen Cox
Microsoft Excel 2013	Microsoft Inc., Redmont, WA, USA
Microsoft Word 2013	Microsoft Inc., Redmont, WA, USA
Perseus Version 1.5.1.6	Computational Systems Biochemistry, max planck institute of biochemistry, Munich, Prof. Jürgen Cox

Tabelle 4 Liste aller verwendeten Softwares und Programme

2.5 Puffer- und Lösungsprotokolle

Bei den Versuchen wurden durchweg handelsübliche Chemikalien verwendet und Lösungen nach gängiger Laborpraxis unter sterilen Bedingungen angefertigt. Die Lagerung erfolgte bei gängigen Bedingungen – meistens bei 4 °C.

Bei manchen Lösungen waren besondere Fertigungsschritte oder eine definierte Lagerung oder Entsorgung notwendig. Diese sind in folgender Tabelle aufgeführt.

Puffer/ Lösung (Endvolumen des jeweiligen Protokolls)	Herstellungsprotokoll und Lagerung
4 % SDS-Puffer in 100 mM Tris-HCl pH 7,6 (100 ml)	20 ml SDS-Stock abmessen und in einen 100 ml Messzylinder füllen. 10 ml 1 M Tris-HCl pH 7,6 abfüllen und dazugeben. Mit ddH ₂ O auf ca. 80 ml auffüllen, den pH kontrollieren und evtl. mit 1 M HCl auf pH=7,6 titrieren. Mit ddH ₂ O auf 100 ml auffüllen. Als 5 ml Aliquots bei -20 °C lagern.
DTT 1 M (5 ml)	0,77125 g DTT abwiegen und in einen 10 ml Messzylinder geben. Einen Magnetprüher dazugeben. Mit ddH ₂ O auf ca. 4 ml auffüllen und warten, bis sich das DTT gelöst hat. Das Volumen mit ddH ₂ O auf 5 ml auffüllen. Die Lösung anschließend steril filtrieren. Lagerung bei -20 °C. Als 10 µl Aliquots in 1,5 ml Reaktionsgefäße einfrieren.
1x MOPS-Puffer (500 ml)	25 ml MOPS 20x Puffer mit dem Pipetboy in einen 500 ml Messzylinder geben und anschließend mit ddH ₂ O auf 500 ml auffüllen. Lagerung bei RT.
Fixierlösung "Fix"	In einem 50 ml Reaktionsgefäß mischen: 20 ml ddH ₂ O, 25 ml Methanol, 5 ml Eisessig. Lösung immer frisch ansetzen.
Färbelösung "Stain"	In einem 50 ml Reaktionsgefäß mischen: 27,5 ml ddH ₂ O, 10 ml Methanol, 10 ml Stainer A. Lösung immer frisch ansetzen.
20 % SDS-Puffer (100 ml)	20 g SDS abwiegen und in einen 100 ml Messzylinder geben. Einen Magnetprüher dazugeben und mit ddH ₂ O auffüllen auf ca. 80 ml. Anschließend rühren lassen, bis

	sich das DTT vollständig gelöst hat. Danach mit ddH ₂ O auf 100 ml auffüllen.
1 M Tris-HCl pH 7,6 (1l)	121,14 g Tris abwiegen, in einen 1 l Messzylinder füllen und ca. 800 ml H ₂ O zufügen. Mit einem Magnetrührer mischen, anschließend mit dem pH-Meter und 1 M HCl auf pH=7,6 einstellen. Auf 1 l mit ddH ₂ O auffüllen. Lagerung bei Raumtemperatur.
100 mM ABC-Puffer (100 ml)	Abwiegen von 7,906 g ABC-Pulver und dieses in einem 100 ml Messzylinder geben. Mit ddH ₂ O auffüllen auf ca. 80 ml und mit einem Magnetrührer mischen, bis sich das Pulver vollständig gelöst hat. Anschließend auffüllen auf 100 ml mit ddH ₂ O. Lagerung bei Raumtemperatur.
50 % EtOH (100 ml)	Abmessen von 50 ml Ethanol absolut im 100 ml Messzylinder, anschließend auffüllen auf 100 ml mit ddH ₂ O. Lagerung bei Raumtemperatur.
50 mM ABC/ 50 % EtOH (100 ml)	50 ml EtOH (100 %) und 50 ml 100 mM ABC-Puffer im 100 ml Messzylinder mischen. Lagerung bei Raumtemperatur.
10 mM DTT in 50 mM ABC (1 ml)	10 µl DTT 1 M (tiefgefroren; im 1,5 ml Eppendorf-Tube) mit 990 µl ABC 50 mM auffüllen und mit der Pipette resuspendieren. Rasch verwenden, Lagerung nicht möglich.
50 mM ABC-Puffer (100 ml)	Im 100 ml Messzylinder 50 ml 100 mM ABC-Puffer mit 50 ml ddH ₂ O mischen. Langzeitlagerung bei Raumtemperatur.
55 mM IAA in 50 mM ABC (1 ml)	100 µl 550 mM IAA (voraliquottiert) mit 900 µl 50 mM ABC-Puffer mischen und resuspendieren. Rasch verwenden, Langzeitlagerung nicht möglich.
550 mM IAA (5 ml) in 50 mM ABC-Puffer	508,75 mg IAA abwiegen und in einen 10 ml Messzylinder geben. Mit 50 mM ABC-Puffer auf 5 ml auffüllen, anschließend mit dem Magnetrührer mischen. Auf 1,5 ml Reaktionsgefäße als 100 µl-Portionen verteilen.

	<p>Die Lösung nicht dem Licht aussetzen, sie dementsprechend im abgedunkelten Raum ansetzen. Lagerung bei -20 °C. Die Reaktionsgefäße in Aluminiumfolie einwickeln.</p>
Trypsin 12,5 ng/µl (1,6 ml)	<p>Ein 2,0 ml Reaktionsgefäß mit 50 mM ABC-Puffer befüllen, auf Eis legen und für 20 min abkühlen lassen. Ein Trypsin-Tube (Inhalt: 20 µg) aus dem Eisschrank holen und ebenfalls auf Eis legen. Mit der 1000 µl Pipette 1,6 ml 50 mM ABC-Puffer ins Trypsin-Tube geben und resuspendieren (die geringe Trypsinmenge wird in 2,0 ml-Tubes geliefert, weshalb dieses Volumen gefasst wird), zum weiteren Vermischen vortexen. Weiterhin ständig auf Eis halten.</p> <p>Langfristige Lagerung bei -80 °C, übergangsweise Lagerung auch bei -20 °C möglich. Das Trypsin kann in ABC-Puffer gelöst bei unvollständigem Verbrauch wieder eingefroren und gelagert werden. In dem Fall bei Wiederverwendung das Tube auf Eis auftauen lassen. Dieser Vorgang kann durch gelegentliches Vortexen beschleunigt werden.</p>
30 % ACN/ 3 % TFA in ddH₂O (100 ml)	<p>Im 100 ml Messzylinder: Mit der 1000 µl Pipette 3 ml TFA in einen Messzylinder geben und auf ca. 50 ml mit ddH₂O auffüllen. Zugabe von 30 ml ACN (Pipettierhilfe). Auffüllen auf 100 ml mit ddH₂O. Durch anschließendes Schwenken mischen.</p> <p>Lagerung bei Raumtemperatur. Bei ACN-haltigen Lösungen korrekte Entsorgung beachten.</p>
70 % ACN (100 ml)	<p>Im 100 ml Messzylinder 70 ml ACN abmessen und mit ddH₂O auf 100 ml auffüllen.</p> <p>Lagerung bei Raumtemperatur. Bei ACN-haltigen Lösungen korrekte Entsorgung beachten.</p>
A*: 1 % TFA/ 5 % ACN (100 ml)	<p>Im 100 ml - Messzylinder: Mit der 1000 µl Pipette 1 ml TFA in den Messzylinder geben. Auffüllen mit ddH₂O</p>

	<p>auf ca. 50 ml. Zugabe von 5 ml ACN (Pipettierhilfe). Anschließend auffüllen auf 100 ml mit ddH₂O.</p> <p>Lagerung bei Raumtemperatur. Bei ACN-haltigen Lösungen korrekte Entsorgung beachten.</p>
B: 80 % ACN/ 0,5 % HAc (100 ml)	<p>Im 100 ml Messzylinder: Abmessen von 80 ml ACN. Mit der 1000 µl Pipette Zugabe von 0,5 ml Essigsäure. Auffüllen auf 100 ml mit ddH₂O (Pipettierhilfe).</p> <p>Lagerung bei Raumtemperatur. Bei ACN-haltigen Lösungen korrekte Entsorgung beachten.</p>
A: 0,5 % HAc in ddH₂O (100 ml)	<p>Im 100 ml Messzylinder: Mit der 1000 µl Pipette Zugabe von 0,5 ml Essigsäure und anschließendes Auffüllen auf 100 ml mit ddH₂O.</p> <p>Lagerung bei Raumtemperatur.</p>
6 % Dextran in 0,9 % NaCl (500 ml)	<p>In einen 500 ml Messzylinder einen Magnetprüher geben. 30 g Dextran in einer Waagschale abwiegen und vorsichtig in den Messzylinder geben. 450 ml NaCl 0,9 % (B. Braun) vorsichtig hinzugeben. Den Messzylinder auf einem Heizprüher platzieren. Diesen auf 50 °C und Stufe 8 einstellen und warten, bis sich das komplette Dextran gelöst hat (Dauer: ca. 3 h). Den Spiegel mit NaCl 0,9 % auf 500 ml auffüllen (Pipettierhilfe). Die Lösung anschließend steril filtrieren und in eine sterile 500 ml Glasflasche füllen. Auf 50 ml Reaktionsgefäße verteilen (Pipettierhilfe).</p> <p>Lagerung bei 4 °C.</p>
ATP	<p>ATP (ATP NLRP3 inflammasome Inducer) auftauen, in einen 50 ml Messzylinder geben und in 10 ml Aqua Braun lösen (Magnetprüher). Mit weiteren 5 ml Aqua Braun das ATP-Glasgefäß ausspülen, sodass man ca. 15 ml ATP-Wasser-Gemisch erhält. Diese Lösung nun mit NaOH 1 M titrieren und auf einen pH-Wert von 7,2 einstellen. Mit dem Pipetboy nun das Volumen ermitteln</p>

	<p>und mit weiterem Aqua Braun auf 18,2 ml auffüllen. Somit erhält man eine 100 mM-Lsg. Aufziehen der Lösung mit einer 20 ml-Spritze und steril filtrieren. Aliquotieren als 500 µl-Portionen.</p> <p>Lagerung bei -20 °C.</p>
LPS	<p>LPS (LPS-EB Ultrapure) auftauen, in 1 ml Aqua Braun lösen (1000 µl Pipette) und vortexen, bis es vollständig gelöst ist. Die Konzentration beträgt nun 5 mg/ml. Um eine Konzentration von 100 µg/ml zu erreichen, die Lösung mit 49 ml Aqua Braun verdünnen. Die LPS-Lsg. in ein 50 ml Reaktionsgefäß geben. Das LPS-Gefäß 3-mal mit jeweils 1 ml Aqua Braun spülen und die Spüllösung dem 50 ml Reaktionsgefäß jeweils zufügen. 46 ml Aqua Braun in das 50 ml Reaktionsgefäß geben, sodass ein Endvolumen von 50 ml erreicht wird. Die LPS-Lsg gut durchmischen. Aliquotieren von 500 µl-Portionen.</p> <p>Lagerung bei -20 °C.</p>
RPMI-Medium (+10 % FCS, +1 % G, +1 % P/S)	<p>52 ml RPMI-Medium (RPMI 1640) aus einer 500 ml-Flasche abnehmen (Pipetboy). 50 ml fötales Kälberserum hinzufügen (Pipetboy). 1 ml Penicillin-Streptomycin und 1 ml L-Glutamin hinzufügen (1 ml Pipette).</p> <p>Lagerung bei 4 °C.</p>

Tabelle 5 Liste wichtiger Puffer- und Lösungsprotokolle

3 Methoden

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Labormethoden angewandt und miteinander kombiniert. An dieser Stelle sind alle relevanten Arbeitsschritte aufgeführt und in ihrer zeitlichen Chronologie veranschaulicht.

3.1 Probandenkollektiv und Ausschlusskriterien

Von jedem Patienten und Probanden wurde vor der Probenentnahme das Einverständnis zur Teilnahme an der Studie eingeholt und schriftlich bestätigt. Das Aktenzeichen des positiven Ethikvotums lautet FF 17/2011.

Eingeschlossen in das Patientenkollektiv wurden nur Patienten mit koronarangiographisch nachgewiesenem STEMI. Die Patienten wurden in der Kerckhoff-Klinik in Bad Nauheim akquiriert.

Als gesunde Kontrollen wurden Probanden zwischen 20 und 30 Jahren ausgewählt. Diese Population wurde ebenfalls für die Zellkulturversuche genutzt.

Für beide Kollektive galten dieselben Ausschlusskriterien. So sollte das Risiko für den Einfluss anderer inflammatorischer Zustände und Pathologien auf die Pathophysiologie der neutrophilen Granulozyten minimiert werden. Aufgrund des insgesamt kleinen Probandenkollektivs wurden nur männliche Probanden eingeschlossen, um zyklusabhängige Einflüsse auf die Ergebnisse auszuschließen. Zudem wurden folgende Ausschlusskriterien definiert:

- Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises
- chronisch-entzündliche Erkrankungen
- bekannte neoplastische Erkrankung
- Autoimmunerkrankungen
- chronische und akute Infektionen

3.2 Schaffung eines sterilen Arbeitsumfeldes

Zu Beginn der Arbeit wurde der Abzug der Sicherheitswerkbank eingeschaltet und das Arbeitsfenster bis zur vorgegebenen Maximalstellung geöffnet. Es wurden Nitril-Handschuhe angelegt und diese mit 80 %-iger Ethanol-Lsg. desinfiziert. Anschließend wurden Arbeitsflächen, Pipetten, Ständer usw. mit derselben Ethanol-Lsg. desinfiziert. Die Sicherheitswerkbank blieb bei eingeschaltetem Abzug für dreißig Minuten unbenutzt, um ein möglichst steriles Arbeitsumfeld zu erzeugen. Im Allgemeinen wurde im sterilen

Raum der Sicherheitswerkbank möglichst vorsichtig, langsam und ausschließlich mit desinfizierten Handschuhen gearbeitet.

3.3 Zellisolation

Mittels dieses Protokolls wurden in mehreren Schritten aus Vollblut die enthaltenen neutrophilen Granulozyten gewonnen und von den anderen Blutbestandteilen getrennt. Sie standen so weiteren Analysemethoden, wie zum Beispiel der Massenspektrometrie, zur Verfügung.

Die Blutentnahmeröhrchen, gefüllt mit Patientenblut, wurden mit einem in 80 %-iger Ethanol-Lsg. getränkten Papiertuch abgewischt und unter die Sicherheitswerkbank gelegt. Die Blutentnahmeröhrchen wurden aufgeschraubt und mit einer Pipettierhilfe in einem 50 ml Reaktionsgefäß zusammengeführt (ca. 1,0 ml verblieben stets in einem Blutentnahmeröhrchen und wurden für die durchflusszytometrische Analyse (FACS, für engl. fluorescence-activated cell sorting) auf Eis oder im Kühlschrank aufbewahrt). In das 50 ml Reaktionsgefäß wurde nun zum Blutvolumen 6 %-ige Dextran-Lsg. pipettiert, wobei die Menge Dextran-Lsg. der Hälfte des Blutvolumens entsprach. Der Deckel wurde anschließend verschlossen und der Inhalt durch wiederholtes langsames Überkopfdrehen des Gefäßes gemischt. Anschließend wurde das Blut-Dextran-Gemisch gleichmäßig und blasenfrei auf vier zuvor bereitgestellte 15 ml Reaktionsgefäße verteilt und im Reaktionsgefäßständer unter Ruhe stehen gelassen. Das Polysaccharid Dextran bindet an die Erythrozyten und bedingt ihr rasches Sedimentieren.

Nach ungefähr 30 Minuten war eine deutliche Trennung der zum Gefäßboden gesunkenen Erythrozyten von den restlichen Blutbestandteilen in wässriger Lösung zu erkennen (Abbildung 2). Die leukozytenreiche wässrige Phase wurde nun vorsichtig mit einer Pipettierhilfe abgenommen und in zwei frische 15 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Erythrozytenphase wurde verworfen.

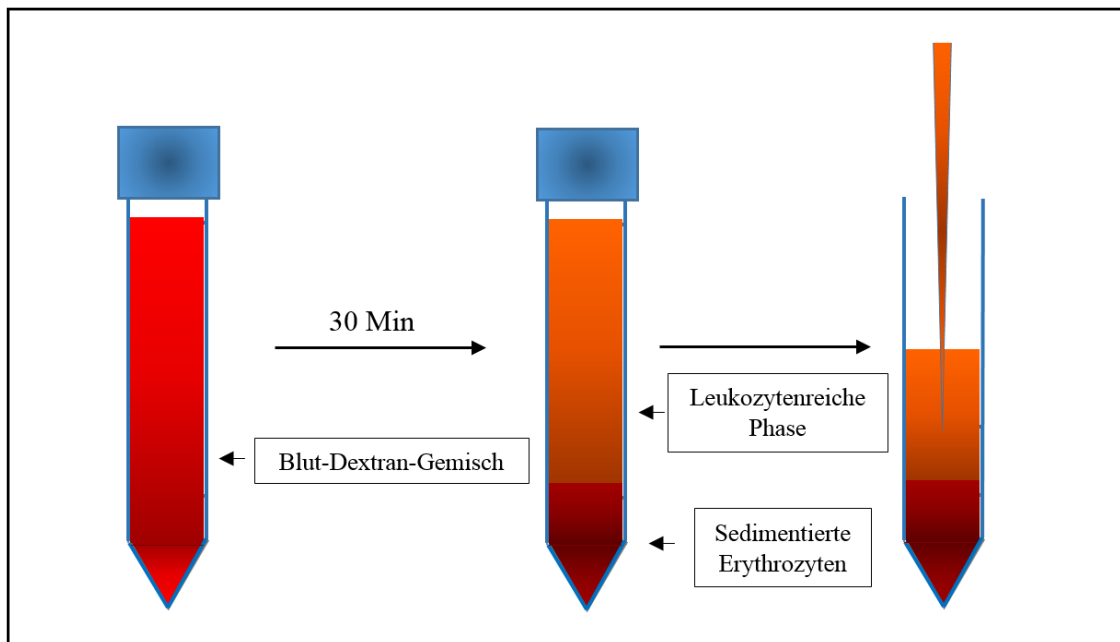


Abbildung 2 Dextran-Sedimentation

Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (große Zentrifuge, 10 min, 300 rcf, 4 °C), wonach sich am Gefäßboden mit wenigen Erythrozyten verunreinigte Leukozytenpellets befanden. Darüber befand sich eine wässrige Phase. Der Überstand wurde mit einer Glaspasteurpipette abgesaugt und verworfen.

Eines der Pellets wurde nun in 1 ml gekühlter 1 x PBS-Lsg. resuspendiert und die Suspension des ersten Reaktionsgefäßes anschließend in das zweite Reaktionsgefäß übertragen (1000 µl Pipette). Das dort enthaltene Zellpellet wurde dann durch Resuspension ebenfalls in die Suspension aufgenommen und so mit dem ersten Zellpellet zusammengeführt (1000 µl Pipette).

Nun wurde eine hypotone Zelllyse durchgeführt, um die Leukozytenpellets von weiteren Erythrozytenrückständen zu befreien. Durch rasche Zugabe von 9 ml eisgekühltem destillierten Wasser (Aqua Braun) mittels Pipettierhilfe wurde die Zelllyse gestartet. Nach zwanzig Sekunden wurde der Lysevorgang durch Zugabe von 1 ml 10 x PBS-Lsg. gestoppt (1000 µl Pipette). Danach wurde das Reaktionsgefäß zentrifugiert (große Zentrifuge, 10 min, 300 rcf, 4 °C). Im anschließenden Schritt wurden die entstandenen Zellpellets inspiziert. Waren sie weißlich und nicht mehr von roten Erythrozyten durchsetzt, wurde der flüssige Überstand mit einer Glaspasteurpipette aus dem Gefäß abgesaugt und verworfen. Das zurückbleibende Zellpellet wurde in 3 ml 1x PBS-Lsg. resuspendiert (1000 µl Pipette). War bei der Inspizierung eine starke rötliche Färbung zu sehen, wurde der Lyseschritt noch einmal wiederholt.

Mittels Dichtegradientenzentrifugation folgte die Auftrennung der Leukozyten in Granulozyten (PMNs, für engl. Polymorphonuclear Cells) sowie Lymphozyten und Monozyten (PBMCs, für engl. Peripheral Blood Mononuclear Cells).

Hierzu wurden in ein frisches 15 ml Reaktionsgefäß 3 ml eisgekühltes Histopaque 1077 (Sigma Aldrich) gegeben und dieses anschließend vorsichtig mit der Zellsuspension überschichtet (Pipettierhilfe). Es folgte eine Zentrifugation (große Zentrifuge, 30 min, 700 rcf, 4 °C) mit ausgeschalteter Bremse, was die Zentrifugationszeit auf circa 40 min verlängerte. Durch die Zentrifugation setzten sich die PMNs am Boden des Reaktionsgefäßes ab, wohingegen sich die PBMCs an der Grenzschicht zwischen Trennmedium (Histopaque 1077) und wässriger Phase anreicherten (Abbildung 3).

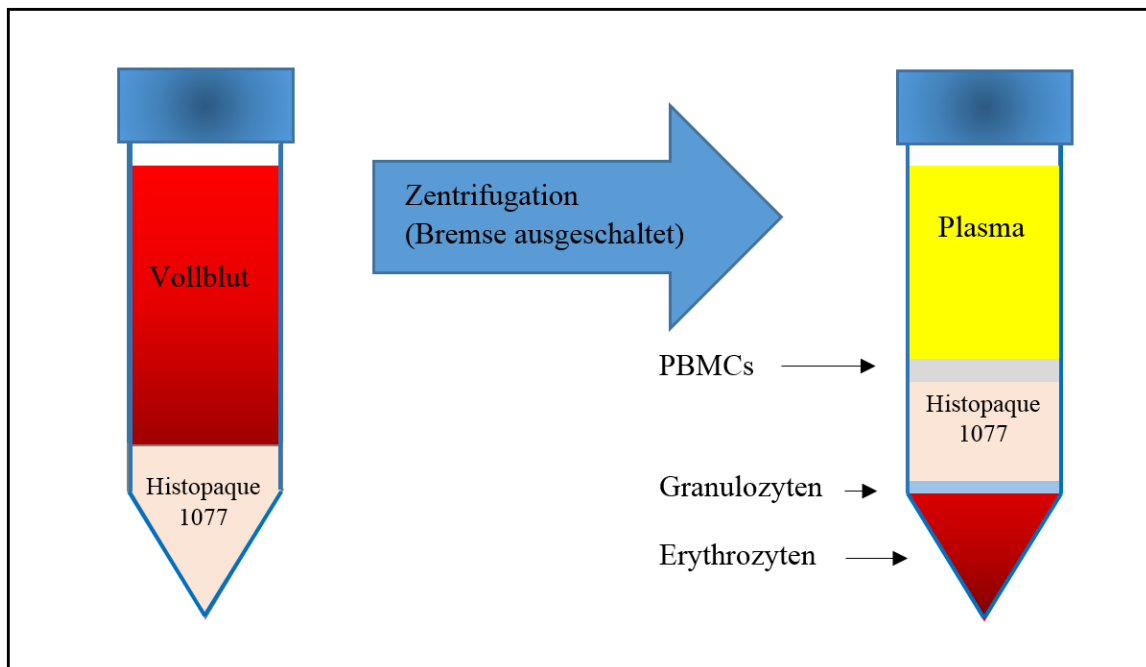


Abbildung 3 Trennung der Granulozyten von restlichen Blutbestandteilen (modifiziert nach (Hoffmann 2013))

Anschließend wurde das Gefäß vorsichtig aus der Zentrifuge genommen und der gesamte Überstand, die wässrige Phase, die PBMC-Schicht und das Histopaque 1077 mit einer Glaspasteurpipette abgesaugt und verworfen. Danach wurde das rückbleibende Granulozytenpellet in 1 ml 1 x PBS-Lsg. resuspendiert und in ein neues 15 ml Reaktionsgefäß überführt (1000 µl Pipette).

Um die Granulozyten von eventuellen Histopaquerückständen zu befreien, wurden der Zellsuspension weitere 4 ml 1 x PBS-Lsg. hinzugefügt (Pipettierhilfe) und das Gefäß zentrifugiert (große Zentrifuge, 5 min, 300 rcf, 4 °C). Anschließend wurde der Überstand

abgesaugt und verworfen. Die Zellen wurden in einem Endvolumen von 3 ml 1x PBS-Lsg. durch Resuspension aufgenommen (Pipettierhilfe).

Zur orientierenden Vitalitätskontrolle und zur Erfassung der Zellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension und 90 µl Trypanblau in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt (10 µl Pipette, 100 µl Pipette). Davon wurden wiederum 10 µl in eine Neubauer Zählkammer gegeben und rasch unter dem Mikroskop betrachtet und gezählt (10 µl Pipette). Vitale Zellen schließen den Farbstoff Trypanblau aus und erscheinen daher vor blauem Hintergrund weißlich hell, während avitale Zellen tief blau gefärbt wirken. Die Gesamtzellzahl wurde errechnet und die Zellsuspension nach Bedarf in 1,5 ml und 2,0 ml Reaktionsgefäße aliquotiert (1000 µl Pipette). Es folgte eine Zentrifugation (Tischzentrifuge, 5 min, 300 rcf, 4 °C). Anschließend wurden alle Überstände abgesaugt und verworfen.

Der für die Proteinisolation und die massenspektrometrische Proteomanalyse bestimmte Zellanteil wurde sofort als Zellpellet bei -80 °C eingefroren.

3.4 Puritymessung mittels FACS-Analyse

Mit der durchflusszytometrischen Bestimmung der Reinheit (engl. Purity) lässt sich prüfen, inwiefern eine isolierte granulozytäre Zellsuspension Verunreinigungen von weiteren Leukozytenspezies enthält. Sie dient der Beurteilung, ob die vorherige Isolation erfolgreich und qualitativ zufriedenstellend war. Die FACS-Analyse wurde direkt nach der Zellisolation durchgeführt.

Es wurden 1×10^6 Zellen für die FACS-Analyse verwendet. Die zu analysierende Zellsuspension wurde in ein 5 ml Reaktionsgefäß gegeben und zentrifugiert (Tischzentrifuge, 10 min, 350 rcf, RT). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das verbleibende Zellpellet in 100 µl 1 x PBS aufgenommen.

Die resultierende Zellsuspension wurde mit folgenden Antikörpern inkubiert (Färbung):

- 3 µl PerCP/ Cy5.5 anti-human CD66b
- 2,5 µl Alexa Fluor 488 anti-human CD14 und
- 2,5 µl Alexa Fluor 700 anti-human CD11b

Die Zellsuspension wurde nach Zugabe der Antikörper möglichst im Dunkeln gelagert und wenig Licht ausgesetzt.

Um die Antikörper erfolgreich zu mischen, wurde das 5 ml Reaktionsgefäß leicht gevortext und anschließend für 25 min bei 4 °C inkubiert. Es folgte die Zugabe von 1 ml 1 x PBS und ein Mischen durch leichtes Anvortexen. Das 5 ml Reaktionsgefäß wurde zentrifugiert (Tischzentrifuge, 10 min, 350 rcf, RT) und anschließend der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde danach wieder in 300 µl 1 x PBS resuspendiert.

Die präparierte Zellsuspension wurde nach Protokoll am Durchflusszytometer (BD LSR II Flow Cytometer) analysiert.

3.5 Zellstimulation

Bei den Zellstimulationsversuchen wurden neutrophile Granulozyten von gesunden Probanden direkt im Anschluss an die Zellisolation (Kapitel 3.3) in vitro mit ATP, LPS sowie der Kombination ATP/ LPS inkubiert. Jeweils wurden auch Kontrollen inkubiert. Die Methode der Stimulation orientierte sich an der Vorgehensweise von Hornung et al. (Hornung et al. 2008).

40 ml RPMI-Medium (+10 % fötales Kälberserum, +1 % L-Glutamin, +1 % Penicillin/Streptomycin) wurden in ein 50 ml Reaktionsgefäß abgefüllt und während der Endphase der Granulozytenzellisolation im Wasserbad auf 37 °C aufgewärmt. Im Anschluss an die Zellisolation aus frischem Probandenblut wurden 80×10^6 Granulozyten (bzw. der entsprechende Volumenanteil aus der Zellsuspension der in 1 x PBS gelösten Granulozyten) in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Abzentrifugation der Suspension (große Zentrifuge, 10 min, 300 rcf, 4 °C) und Absaugen des Überstandes.

Von den 40 ml RPMI-Medium wurden 2 ml (1000 µl Pipette) aus dem 50 ml Reaktionsgefäß entnommen und in das 15 ml Reaktionsgefäß mit den Granulozyten übertragen. Die Zellen wurden gründlich im Medium resuspendiert. Danach erfolgte eine Übertragung der Zellen in das 50 ml Reaktionsgefäß.

Nach Resuspension (Pipettierhilfe) wurde 1 ml Zellsuspension vom 50 ml Reaktionsgefäß in das 15 ml Reaktionsgefäß überführt und dort wiederum resuspendiert (1000 µl Pipette), um Zellrückstände mit aufzunehmen. Es erfolgte eine Rückübertragung der

Restsuspension aus dem 15 ml Reaktionsgefäß in das 50 ml Reaktionsgefäß. Es wurde somit eine Endkonzentration von 2×10^6 Zellen/ml erreicht.

Anschließend wurden die 40 ml Zellsuspension auf zwei 6-Well-Zellkulturplatten verteilt (Pipettierhilfe). Dabei wurden pro Well 3,33 ml Medium abgefüllt und somit 12 Wells befüllt. Zwischendurch wurde wiederholt resuspendiert, um eine homogene Zellverteilung zu gewährleisten.

Zum Verteilen der Zellen wurden die 6-Well-Platten vorsichtig geschwenkt (vorne-hinten, links-rechts, kreisförmig). Danach wurde die Zelldichte mikroskopisch kontrolliert (Gütekriterien waren dabei: Eine homogene Verteilung der Zellen mit Bildung von Zellgruppchen von 5-10 Zellen bei einem geringen Prozentsatz ($< 5\%$) an apoptotischen Zellen).

Es folgte nun die Stimulation der Granulozyten. Dazu wurden in die entsprechenden Wells (s.u.) 3,33 μ l LPS (100 μ g/ml; 10 μ l Pipette) oder 166,5 μ l ATP (100 mM; 200 μ l Pipette) gegeben und vorsichtig resuspendiert. Bei den LPS+ATP-Wells wurde zunächst nur 3,33 μ l LPS (100 μ g/ml; 10 μ l Pipette) zugegeben. Die Anordnung der Wells ist in Abbildung 4 dargestellt. Die Endkonzentration von ATP betrug somit 5 mM und die von LPS 100 ng/ml.

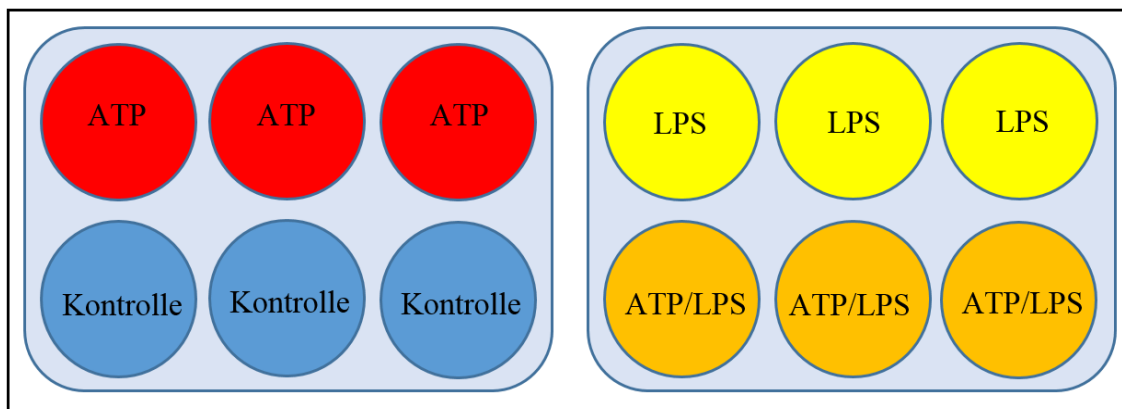


Abbildung 4 6-Well-Platten bei den Stimulationsversuchen

Die 6-Well-Platten wurden noch einmal geschwenkt und anschließend für 3 h bei 37 °C/ 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Nach 3 h wurde den LPS+ATP-Wells 166,5 μ l ATP (100 mM; 200 μ l Pipette) zugefügt und das Stimulanz durch vorsichtige Resuspension verteilt. Es folgte eine Inkubation aller 6-Well-Platten für weitere 3 h.

Die Wells wurden mit der in ihnen vorhandenen Zellsuspension vorsichtig ausgespült (1000 µl Pipette) und diese dann in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Dabei wurden die einzelnen Gruppen (ATP, LPS, ATP/ LPS, Kontrolle) jeweils zusammengeführt, so dass vier 15 ml Reaktionsgefäße mit jeweils 9,99 ml Inhalt resultierten.

Jedes Well wurde mit 1 ml 1 x PBS befüllt und ausgespült (1000 µl Pipette). Der Überstand wurde anschließend in das Reaktionsgefäß überführt, in dem sich bereits die aus den entsprechenden Wells stammende Zellsuspension befand.

Für jedes einzelne 15 ml Reaktionsgefäß galt: Das Reaktionsgefäß wurde zentrifugiert (große Zentrifuge, 10 min, 300 rcf, 4 °C) und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 5 ml 1 x PBS gewaschen (1000 µl Pipette) und erneut zentrifugiert (große Zentrifuge, 10 min, 300 rcf, 4 °C). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde in 1 ml 1 x PBS resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt (1000 ml Pipette). Danach wurde das Reaktionsgefäß mit 1 ml 1 x PBS ausgespült und dieser ebenfalls dem 2 ml Reaktionsgefäß zugefügt (1000 ml Pipette). Anschließend erfolgte eine Zentrifugation des Reaktionsgefäßes (Tischzentrifuge, 5 min, 350 rcf, 4 °C) und das Absaugen des Überstandes.

Die Granulozytenzellpellets wurden in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.6 Aufbereitung der Proben für die Massenspektrometrie

In mehreren Schritten wurden die in den Granulozytenpellets gelösten Proteine bearbeitet und am Ende auf STAGE-Tips (für engl. Stop and Go Extraction Tips) geladen. Dies erfolgte, um sie der massenspektrometrischen Messung zugänglich zu machen. Die beladenen STAGE-Tips können bei 4 °C für bis zu 12 Monate gelagert werden, bevor sie gemessen werden.

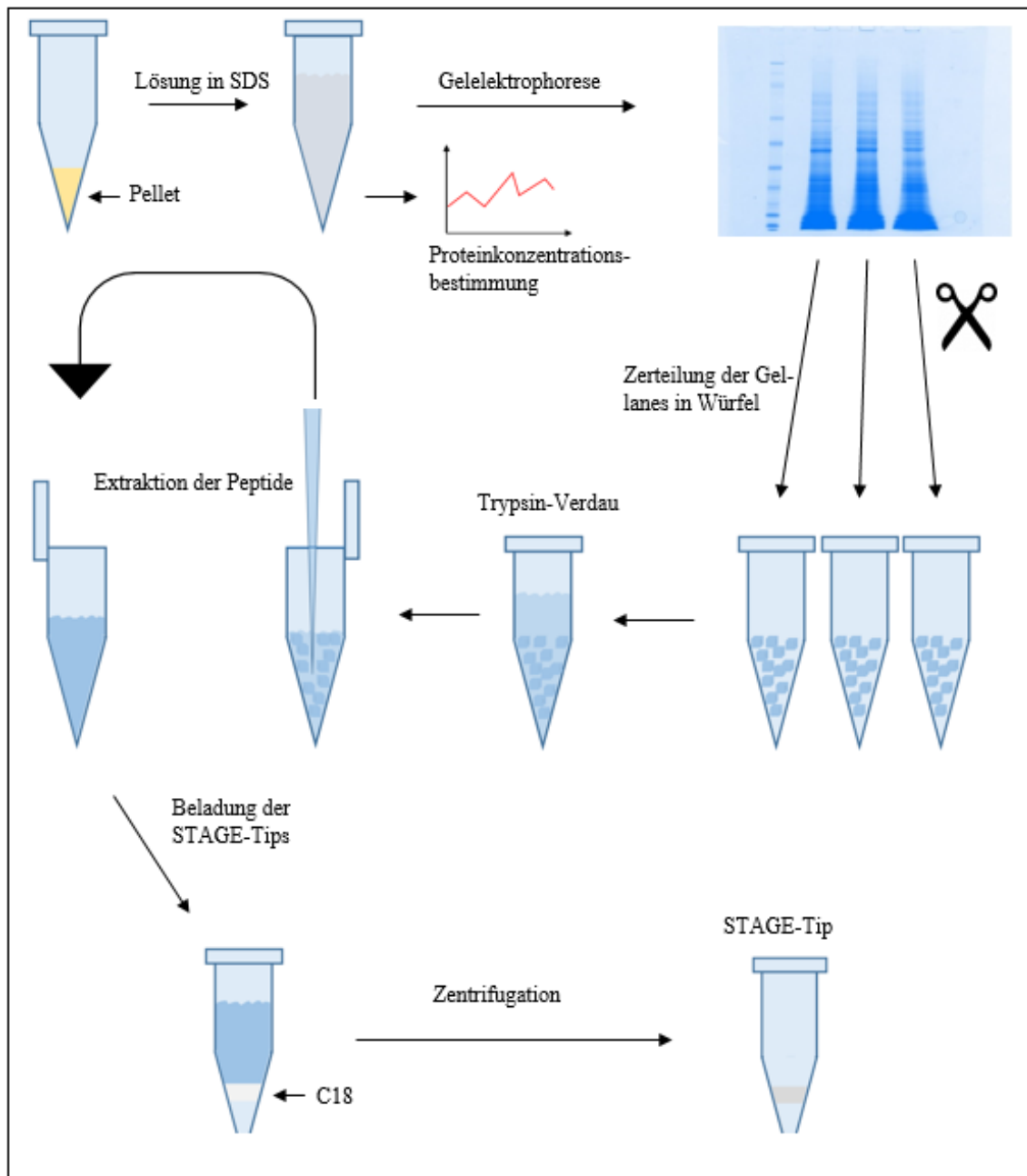


Abbildung 5 Überblick Herstellung der STAGE-Tips

Im ersten Schritt wurden die in den neutrophilen Granulozyten enthaltenen Proteine mit SDS denaturiert und gelöst (Abbildung 5). Die Proteine wurden dann per SDS-Page auf ein Gel geladen. Die einzelnen Lanes wurden in kleine Gelwürfel zerschnitten und die

Proteine mittels der Protease Trypsin verdaut. Die resultierenden Verdauungsprodukte (Peptide) wurden anschließend extrahiert, in C18-Umkehrphasematerial eingebettet und in sogenannten STAGE-Tips gelagert. Sie konnten anschließend massenspektrometrisch gemessen werden.

3.6.1 Pelletaufbereitung und Coomassie-Färbung

Folgend diesem Protokoll, wurden die in den isolierten neutrophilen Granulozyten enthaltenen Proteine photometrisch quantifiziert und gelelektrophoretisch per SDS-PAGE in einem Gel fixiert. Anschließend wurden sie durch eine Coomassie-Färbung des Gels sichtbar gemacht. Das Protokoll wurde mit einem bei -80 °C zuvor eingefrorenen Granulozytenpellet durchgeführt und fand somit nach der Granulozytenisolation (Kapitel 3.3) bzw. nach der Zellstimulation (Kapitel 3.5) statt.

Das gefrorene Granulozytenpellet wurde im Reaktionsgefäß auf Eis gehalten. Ein kleiner Rest 1 x PBS (von der Zellisolation) wurde mit der Pipette vorsichtig abgenommen, so dass nur noch Zellgewebe im Reaktionsgefäß vorhanden war. Anschließend wurde das Pellet gewogen (Feinwaage).

Pro Milligramm Zellgewebe wurden 15 µl SDS-Puffer (4 % SDS in 0,1 M Tris/ HCl; pH 7,6) ins Reaktionsgefäß gegeben. Das Pellet wurde durch Resuspension mittels Pipette vom Gefäßboden gelöst. Durch diesen Schritt wurden die Sekundär- und Tertiärstrukturen der enthaltenen Proteine aufgebrochen.

Das Pellet wurde im folgenden Schritt 10-mal sonifiziert (10 % duty cycle), so dass keine ungelösten Bestandteile mehr sichtbar waren. Das Lysat wurde für 5 min bei 95 °C im Thermomixer inkubiert, um Enzymaktivität zu inhibieren.

Nach anschließender Zentrifugation der Reaktionsgefäße (Tischzentrifuge, 10 min, 16.000 rpm, RT) setzte sich am Boden ein DNA-Pellet als Rückstand ab. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert, um ihn so von der DNA zu trennen. Dies geschah, da die DNA die Messungen der folgenden Schritte verfälschen würde.

Die Proteinkonzentrationsbestimmung der Proben wurde nach den Angaben des Herstellers mit dem Bio-Rad DC Protein Assay durchgeführt. Das Messprinzip dieses Assays beruht auf der Proteinbestimmung nach Lowry (LOWRY et al. 1951).

Erstens wurden für jede Probe 2 µl Probenvolumen mit 10 µl H₂O, 25 µl Reagenz A und 200 µl Reagenz B in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Zweitens wurde eine Eichreihe mit dem BSA-Proteinstandard in fünf verschiedenen Konzentrationen angelegt. Alle Proben- und Proteinstandardreaktionsgefäße wurden dabei als Duplikate angelegt.

Die Reaktionsgefäße wurden kurz gevortext und anschließend für 15-30 min bei Dunkelheit und Raumtemperatur gelagert.

Anschließend wurden aus jedem Reaktionsgefäß 200 µl in eine 96-Well-Platte gegeben. Dabei waren die Messung verfälschende Blasen zu vermeiden, indem die Pipette gleichmäßig und langsam durchgedrückt wurde.

Die Messung erfolgte im Photometer. Die Absorption wurde bei 760 nm gemessen und die Werte mit dem Programm Fluostar 32 ausgewertet. Die Messung erfolgte in Duplikaten, aus denen ein Mittelwert gebildet wurde.

100 µg Protein wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen. Dem Reaktionsgefäß wurde der Ladepuffer (NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X)) zugefügt. Die Menge des Ladepuffers entsprach dem 0,33-fachen des Probenvolumens. Nach Zufügen von 2 µl DTT 1 M wurde die Probe für 10 min bei 70 °C im Thermomixer auf niedrigster Schwenkstufe inkubiert.

Für die Gelelektrophorese wurden eine XCell SureLock Mini-Cell-Gelelektrophoresekammer und ein PowerEase 500 Power Supply der Firma Eppendorf verwendet. Als Laufpuffer diente MOPS-Puffer 1 x (Invitrogen). In die innere Kammer der Gelelektrophoresekammer wurden zusätzlich 500 µl Antioxidanz (Invitrogen) gegeben. Die Gelelektrophoresekammer wurde mit NuPAGE Novex 4-12 % Bis-Tris Gelen der Firma Invitrogen bestückt. In die erste Tasche wurden 2 µl Marker (SeeBlue Plus 2 Pre-Stained-Standard, Invitrogen) aufgetragen. Zwischen einzelnen Proben wurde eine Bande frei gelassen, in die 10 µl 1 x LDS aufgetragen wurde. Falls das Probenendvolumen (inkl. 4 x LDS und DTT) das maximale Ladevolumen der Geltaschen überschritt (30 µl), wurde es in zwei Schritten in die Tasche gegeben, wobei der zweite Schritt nach maximal 3 min bereits erfolgter Elektrophorese folgte. Die Auftrennung der Proteine fand bei 175 V für 60-70 min statt.

Die Fixierlösung und die Färbelösung (Tabelle 5) wurden frisch im 50 ml Reaktionsgefäß angesetzt. Nach Ende der Elektrophorese wurde das Gel aus seiner Hartplastikhülle geholt, in eine Plastikbox überführt, mit der Fixierlösung versetzt und für 10 min auf dem Schüttler geschwenkt. Die Fixierlösung wurde anschließend abgegossen, die Färbelösung in die Box gegeben und das Gel für weitere 10 min geschwenkt. Dann wurden 2,5 ml Stainer B (Invitrogen) dazugegeben und das Gel für 16 h (über Nacht) auf dem Schüttler geschwenkt. Anschließend wurde das Gel 5-mal mit ddH₂O entfärbt und dann bei 4 °C gelagert.

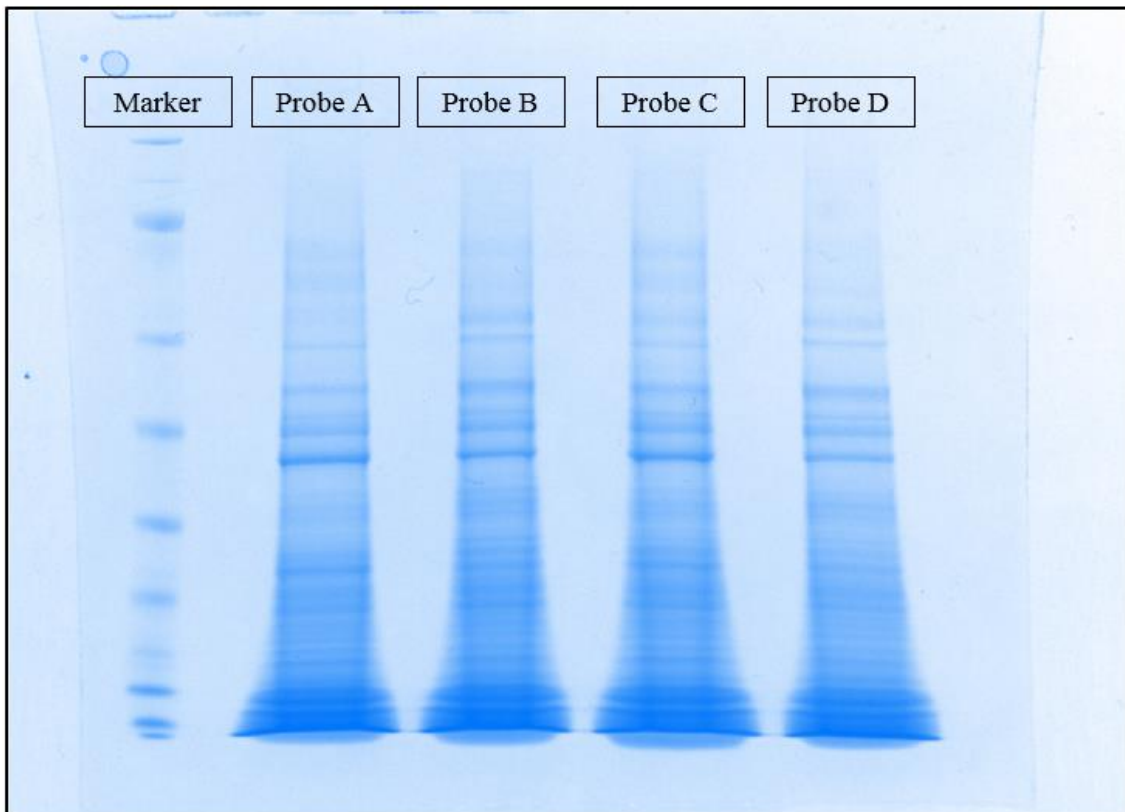


Abbildung 6 Coomassie-gefärbtes Gel, auf welches das Proteinlysate aufgetragen wurde

Das Gel wurde anschließend zur weiteren Verarbeitung und zu Dokumentationszwecken mit einem Imagersystem (ChemiDoc XRS, BioRad) fotografiert (Abbildung 6).

3.6.2 Tryptischer In-Gel-Proteinverdau

In den vorherigen Schritten wurden die granulozytären Proteine elektrophoretisch auf ein Gel aufgetragen und mit dem Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau angefärbt. Mithilfe der Protease Trypsin folgte im jetzigen Schritt der Verdau dieser, weiterhin im Gel fixierten, Proteine (Protokoll „In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins

and proteomes“ – modifiziert nach Prof. Dr. Marcus Krüger, Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung in Bad Nauheim (Shevchenko et al. 2007)).

Durch den Verdau wurden die Proteine in Peptide gespalten. Diese Zerkleinerung der Proteine war notwendig, um eine massenspektrometrische Analyse möglich zu machen. Anschließend wurden die entstandenen Peptide aus dem Gel extrahiert. Mit den Peptiden wurden später die STAGE-Tips beladen.

Auf dem ausgedruckten Gelbild wurden Markierungen in Form von Linien gesetzt, welche die Lanes in einzelne Abschnitte unterteilten. Die Anzahl der Abschnitte betrug immer elf, da so für die spätere Messung geeignete Proteinmengen in jedem Abschnitt vorhanden waren. Die Unterteilungen wurden bei verschiedenen Proben möglichst gleichartig gewählt und nummeriert.

Das Gel wurde anschließend auf einer Folie aus Polyethylenterephthalat (HP) platziert und mit ddH₂O befeuchtet. Jede einzelne Lane wurde, entsprechend den Markierungen auf der Vorlage, mit einem Skalpell in elf Stücke unterteilt. Im nächsten Schritt wurde jedes der resultierenden Gelstücke mit einem Skalpell in circa 1x1x1 mm große Würfel zerkleinert (Abbildung 7).

Alle Würfel, die aus einem der elf Gelstücke resultierten, wurden anschließend in jeweils ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, so dass für jede ursprüngliche Lane elf Reaktionsgefäße befüllt wurden. Die Reaktionsgefäße wurden kurz abzentrifugiert (Minizentrifuge), so dass sich die Gelstücke am Boden des Reaktionsgefäßes ansammelten.

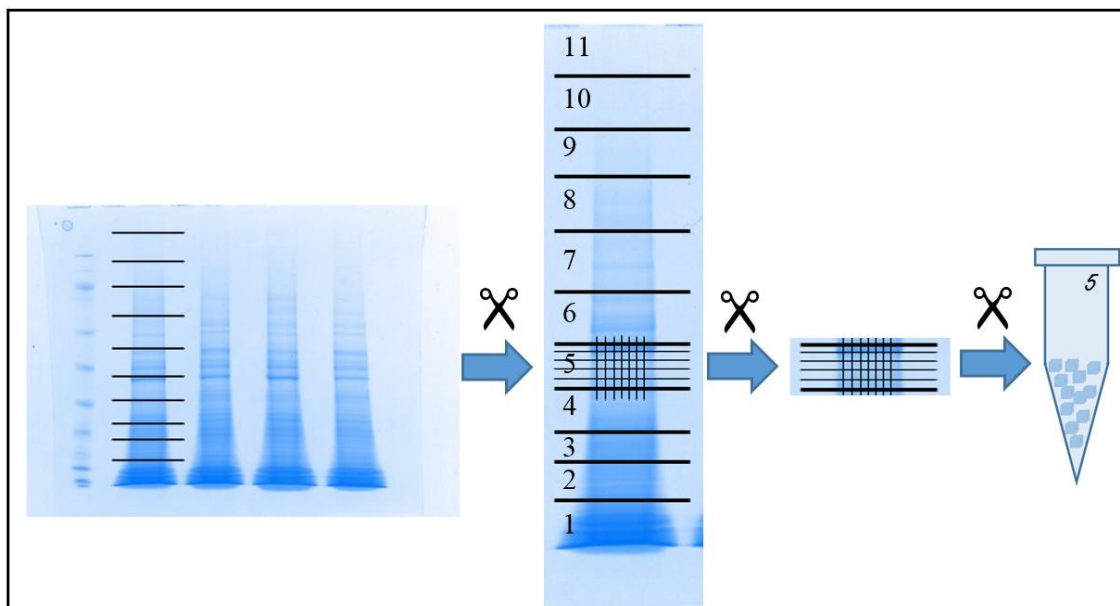


Abbildung 7 Zerkleinerung des Gels

Folgende Schritte wurden mit jedem Reaktionsgefäß durchgeführt, um die Gelstücke zu waschen und zu dehydrieren:

- Waschen: Auf die Gelstücke wurden 100 µl 50 mM Ammoniumbicarbonat (ABC) in ddH₂O/ 50 % Ethanol gegeben (Multipette). Die Reaktionsgefäße wurden für 20 min stengelassen (RT), anschließend wurde der flüssige Überstand abgesaugt und verworfen (200 µl Pipette).
- Der vorherige Schritt wurde ein zweites Mal durchgeführt.
- Dehydrierung: Auf die Gelstücke wurden 100 µl Ethanol absolut gegeben und die Reaktionsgefäße kurz gevortext. Die Reaktionsgefäße wurden für 5 min stengelassen (RT) und anschließend die Flüssigkeit abgesaugt und verworfen (200 µl Pipette).
- Der vorherige Schritt wurde ein zweites Mal durchgeführt.
- Die Gelstücke wurden für 5 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

Zur Reduktion der Proteine wurden in jedes Reaktionsgefäß 100 µl 10 mM DTT (in 50 mM ABC in ddH₂O) gegeben und die Gelstücke für 45 min inkubiert (56 °C, Thermomixer). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und verworfen (200 µl Pipette).

Zur Alkylierung der Proteine wurden in jedes Reaktionsgefäß 100 µl 55 mM Iodacetamid (in 50 mM ABC in ddH₂O) gegeben und die Gelstücke für 30 min inkubiert (RT, im Dunkeln). Anschließend wurde der flüssige Überstand abgesaugt und verworfen (200 µl Pipette).

Folgende Schritte wurden anschließend mit jedem Reaktionsgefäß durchgeführt:

- Waschen: Auf die Gelstücke wurden 100 µl 50 mM ABC (in ddH₂O) gegeben und die Reaktionsgefäße für 15 min stengelassen (RT). Anschließend wurde der flüssige Überstand abgesaugt und verworfen (200 µl Pipette).
- Zur Dehydrierung wurden 100 µl Ethanol absolut für 15 min bei RT auf die Gelstücke gegeben. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und verworfen (200 µl Pipette).

- Waschen: Auf die Gelstücke wurden 100 µl 50 mM ABC (in ddH₂O) gegeben und die Reaktionsgefäße für 15 min stehengelassen (RT). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und verworfen (200 µl Pipette).
- Zur Dehydrierung wurden 100 µl Ethanol absolut auf die Gelstücke gegeben und die Reaktionsgefäße für 15 min stehengelassen (RT). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und verworfen (200 µl Pipette).
- Der vorherige Schritt wurde ein zweites Mal durchgeführt.
- Die Gelstücke wurden für 5 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet (30 °C).

In jedem Reaktionsgefäß wurden dann 40 µl Trypsin (40 ng/µl in 50 mM ABC (in ddH₂O), 4 °C) auf die getrockneten Gelstücke gegeben. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße für 15 min auf Eis gelagert. Die Gelstücke schollen an und nahmen die Trypsinlösung auf. Damit sie nicht austrockneten, wurde den Gelstücken danach so viel 50 mM ABC (in ddH₂O) hinzugefügt, dass sie mit Flüssigkeit bedeckt waren.

Es folgte eine Inkubation für 1 h bei 37 °C. Danach wurde noch einmal kontrolliert, ob alle Gelstückchen von Flüssigkeit bedeckt waren – falls dieses nicht der Fall war, wurde weiteres 50 mM ABC (in ddH₂O) auf die Gelstücken gegeben, bis sie von Flüssigkeit bedeckt waren.

Der sich anschließende fortlaufende Proteinverdau bei 37 °C (Brutschrank) erfolgte über Nacht (12-16 h).

In den nächsten Schritten wurden die Verdauprodukte (Peptide) jedes mit Gelstückchen beladenen Reaktionsgefäßes gesammelt. Dies wurde durch Eluierung mittels Acetonitril in steigender Konzentration durchgeführt. Für jedes Reaktionsgefäß wurde ein 1,5 ml-Referenz Reaktionsgefäß (ebenfalls elf an der Zahl pro ursprünglicher Lane) angelegt, in welches die Flüssigkeit mit den Verdauprodukten übertragen und diese so von den Gelstückchen getrennt wurde.

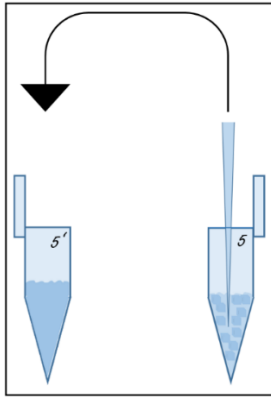


Abbildung 8 Überführung der Verdauungsprodukte in ein Referenz Reaktionsgefäß

Im ersten Separationsschritt wurde aus jedem Reaktionsgefäß die Flüssigkeit entnommen und ins jeweilige Referenz Reaktionsgefäß überführt (200 µl Pipette; Abbildung 8).

Nun wurden die Verdauprodukte aus den Gelstücken extrahiert:

- In jedes Gelstücke enthaltende Reaktionsgefäß wurden 100 µl 30 % Acetonitril (ACN)/ 3 % Trifluoressigsäure (TFA) (in ddH₂O) gegeben und die Gelstücke für 20 min inkubiert (RT). Der flüssige Überstand wurde anschließend in das jeweilige Referenz Reaktionsgefäß gegeben (200 µl Pipette).
- In jedes Gelstücke enthaltende Reaktionsgefäß wurden 100 µl 70 % ACN (in ddH₂O) gegeben und die Gelstücke für 20 min inkubiert (RT). Der flüssige Überstand wurde anschließend in das jeweilige Referenz Reaktionsgefäß überführt (200 µl Pipette).
- Der vorherige Schritt wurde ein zweites Mal durchgeführt.
- In jedes Gelstücke enthaltende Reaktionsgefäß wurden 100 µl 100 % ACN gegeben und die Gelstücke für 20 min inkubiert (RT). Der flüssige Überstand wurde anschließend in das jeweilige Referenz Reaktionsgefäß gegeben (200 µl Pipette).
- Der vorherige Schritt wurde ein zweites Mal durchgeführt.

Die Reaktionsgefäße, in denen die Gelstücke enthalten waren, konnten nun verworfen werden, da sie für das weitere Procedere nicht mehr benötigt wurden.

Von nun an wurden alle Schritte mit den extrahierten Peptiden durchgeführt (vorher bezeichnet als „Referenz Reaktionsgefäße“).

Es wurden die gelösten, extrahierten Peptide in den Reaktionsgefäßen aufkonzentriert. Dazu wurden die Proben in der Vakuumzentrifuge bearbeitet (30 °C). So wurde bei jeder Probe die Flüssigkeit bei einem Anfangsvolumen von circa 500 µl (variabel) auf 75 µl

reduziert. Dieser Vorgang dauerte 1:15 h, wobei ab der 50. Minute in zunächst 5-Minuten-Abständen und dann immer hochfrequentierter der Spiegel jeder Probe kontrolliert wurde, um eine überschießende Aufkonzentrierung zu vermeiden.

Nach Beendigung dieses Schrittes wurden jeder Probe 75 µl 1 % TFA/ 5 % ACN (in ddH₂O) zugefügt (Multipette).

3.6.3 Beladung der STAGE-Tips

Um die Peptide für die HPLC (s.u.) und damit der massenspektrometrischen Analyse zugänglich zu machen, wurden sie in C₁₈-Material eingebettet. Dies wurde durch die Herstellung von STAGE-Tips realisiert, bei denen zwei Scheiben von C₁₈-Material in eine Pipettenspitze gedrückt wurden, um anschließend manuell mit der zu analysierenden Probe beladen zu werden. C₁₈ ist ein sehr hydrophobes Material, was dazu führt, dass die ebenfalls hydrophoben Peptide sich leicht an dieses Material binden und somit immobilisiert sind.

Das Protokoll wurde von der Servicegruppe „Biomolekulare Massenspektrometrie“ (Leitung: Prof. Dr. Marcus Krüger) des Max-Planck-Instituts für Herz- und Lungenforschung in Bad Nauheim bereitgestellt und orientierte sich am Protokoll „Stop and Go Extraction Tips for Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization, Nanoelectrospray, and LC/MS Sample Pretreatment in Proteomics“ (Rappsilber et al. 2003).

Zur Herstellung der STAGE-Tips wurden Empore C₁₈ Octadecyl Disks (Supelco) verwendet. Mit einer Metallkapillare (Innendurchmesser: 1 mm) wurde ein Stück C₁₈-Material aus der Disk gestanzt, indem die Disk auf einen festen Untergrund gelegt und die Metallkapillare senkrecht aufgedrückt wurde, sodass sich ihr Lumen mit C₁₈-Material füllte.

Diese Metallkapillare, in der das Stück C₁₈-Material vorhanden war, wurde nun in eine 200 µl Pipettenspitze von oben bis zum Anschlag eingeführt. Nun wurde ein rundes, elastisches Plastikstäbchen, welches das Lumen der Metallkapillare fast ausfüllte, durch die Metallkapillare geschoben. So wurde das ausgestanzte Stück C₁₈-Material von der Metallkapillare in die Pipettenspitze hineingedrückt (bei mäßiger Druckaufwendung). Dieser Vorgang wurde ein zweites Mal durchgeführt, so dass in die Pipettenspitze übereinander zwei Lagen C₁₈-Material hineingedrückt wurden. Diese Konstruktion nennt man STAGE-Tip (Abbildung 9).

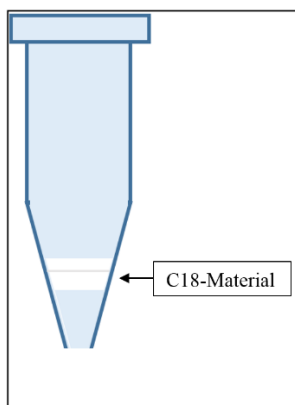


Abbildung 9 STAGE-Tip

Für jede vorher bearbeitete Probe wurde ein STAGE-Tip angelegt.

Zum Waschen der STAGE-Tips wurden bei 2 ml Reaktionsgefäßen der Deckel am Scharnier abgeschnitten. Darauf wurden Adapter gesetzt, die eine Art Deckel für die 2 ml Reaktionsgefäße bildeten und in deren Mitte sich ein Loch befand, in das eine 200 µl Pipettenspitze circa bis zur Hälfte eingeführt werden konnte. Die mit den Adaptern bestückten 2 ml Reaktionsgefäße wurden anschließend in der kleinen Zentrifuge platziert. Von oben wurden die STAGE-Tips in die Löcher der Adapter gesteckt, so dass sich das Ende der Pipettenspitze im Inneren des 2 ml Reaktionsgefäßes befand.

Die Flüssigkeiten/ Chemikalien wurden bei folgenden Schritten zur Aufarbeitung der STAGE-Tips von oben in das aus dem 2 ml Reaktionsgefäß herausragende Stück der STAGE-Tips pipettiert.

- Es wurden 20 µl Methanol absolut (für die HPLC) zugefügt. Anschließend Zentrifugation (Tischzentrifuge, 2 min, 2.600 rpm, RT).
- Es wurden 20 µl 80 % ACN/ 0,5 % HAc (in ddH₂O) zugefügt, anschließende Zentrifugation (Tischzentrifuge, 2 min, 2.600 rpm, RT).
- Es wurden 20 µl 0,5 % HAc (in ddH₂O) zugefügt, anschließende Zentrifugation (Tischzentrifuge, 2 min, 2.600 rpm, RT).

Der letzte Schritt wurde einmal wiederholt, wobei diesmal die Zentrifugationszeit so angepasst wurde, dass ein kleiner Flüssigkeitsfilm (ca. 1 mm stark) auf dem C₁₈-Material bestehen blieb.

Die Proben (Volumen ca. 150 µl: 75 µl Probe angereichert mit 75 µl 1 % TFA/ 5 % ACN (in ddH₂O)) wurden nun auf die STAGE-Tips aufgetragen (200 µl Pipette). Anschließend

erfolgte eine Zentrifugation (Tischzentrifuge, 4 min, 2.600 rpm, RT; Abbildung 10). Danach wurde kontrolliert, ob das komplette Probenvolumen im Zuge der Zentrifugation durch das C₁₈-Material hindurchgepresst wurde. Falls sich noch Flüssigkeit oberhalb des C₁₈-Materials befand, wurde wiederholt zentrifugiert (Tischzentrifuge, 4 min, 2.600 rpm, RT) mit wiederholter Kontrolle und eventuellen weiteren Wiederholungen.

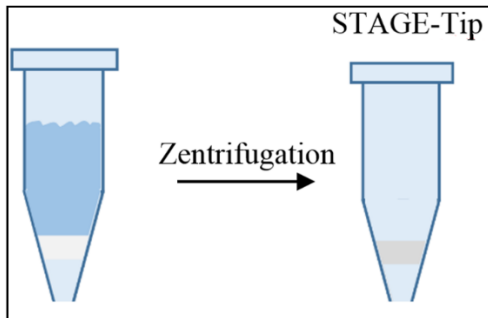


Abbildung 10 Beladung der STAGE-Tips

Anschließend wurden in jeden STAGE-Tip 20 µl 0,5 % HAc (in ddH₂O) gegeben (Multipette). Es folgte eine Zentrifugation (Tischzentrifuge, 4 min, 2.600 rpm, RT).

Im letzten Schritt wurden die STAGE-Tips getrocknet, indem eine mit Luft gefüllte 10 ml-Spritze (B. Braun) auf das großlumige Ende der STAGE-Tips aufgesetzt wurde. Anschließend wurde bei mäßigem Pressen Luft durch das beladene C₁₈-Material gedrückt. Es folgte ein leichter Farbumschlag von grau nach weißlich des C₁₈-Materials und eventuell ein Heraustreten kleinerer Flüssigkeitströpfchen.

3.7 Massenspektrometrische Analyse

Mit Fertigung der STAGE-Tips endete die Probenvorbereitung. Im nächsten Schritt folgte die massenspektrometrische Analyse der Proben. Diese wurde von der Servicegruppe „Biomolekulare Massenspektrometrie“ (Leitung: Prof. Dr. Marcus Krüger) des Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung in Bad Nauheim durchgeführt.

Für die massenspektrometrischen Messungen wurden mehrere Komponenten hintereinandergeschaltet. Der Aufbau und die Messprinzipien werden in diesem Kapitel erläutert. Die massenspektrometrischen Messungen fanden in der Orbitrap statt, der eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) vorgeschaltet war (Abbildung 11).

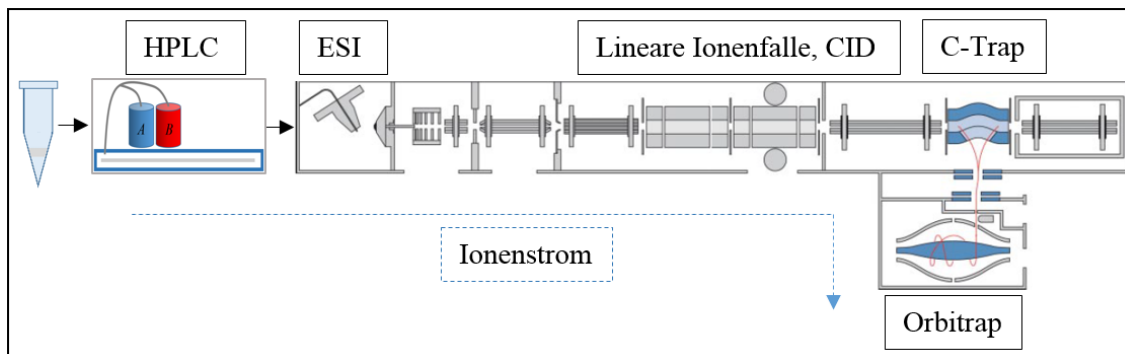


Abbildung 11 Aufbau des Massenspektrometers (stark vereinfacht; Abbildung nach (Olsen, Jesper V. et al 2009))

3.7.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Proben waren zu diesem Zeitpunkt in den STAGE-Tips an das Umkehrphasenmaterial C₁₈ gebunden. Die nun erfolgte Hochleistungsflüssigkeitschromatographie diente der Sortierung der Peptide anhand ihrer Hydrophobizität. Sie wurden somit für die spätere massenspektrometrische Analyse vorfraktioniert und konnten in Portionen dem Massenspektrometer zugeführt werden. Für die Versuche wurden eine Agilent 1200 HPLC und eine Proxeon nano-HPLC verwendet.

Essenzielle Voraussetzung für die Sortierung anhand ihrer Hydrophobizität entlang eines Gradienten mittels der HPLC sind die beiden verwendeten Puffer: Puffer A besteht aus Wasser und 0,5 % Essigsäure. In ihm lösen sich Peptide nur schwach. Puffer B enthält hauptsächlich Acetonitril, welches sehr hydrophob ist und in dem sich die Peptide stark lösen.

Mittels Puffer B wurden die Peptide von den StageTips in eine 96-Well-Platte eluiert. Anschließend erfolgte eine Volumenreduktion in der SpeedVac. Acetonitril als organisches Lösungsmittel evaporiert zuerst, wodurch es aus den Proben entfernt wurde und eine wässrige Lösung der Peptide zurückblieb.

Dann wurden die 96-Well-Platten in die HPLC eingesetzt und alle weiteren Schritte vom Gerät automatisch durchgeführt. Mittels Puffer A erfolgte die Übertragung der Peptide auf die stationäre Phase der HPLC, eine Säule aus C₁₈-Material.

Nun erfolgte die Fraktionierung des Peptidgemisches mittels eines Gradienten. Über eine Zeit von 150 min lief eine Mischung aus Puffer A und Puffer B (mobile Phase) über die mit den Peptiden beladene C₁₈-Säule (stationäre Phase). Dabei bestand die Mischung anfangs hauptsächlich aus Puffer A (Wasser), sodass nur sehr hydrophile Peptide von der C₁₈-Säule gelöst wurden. Im Verlauf wurde der Anteil an Puffer B (Acetonitril) kontinuierlich erhöht, sodass immer mehr hydrophobe Peptide gelöst und dem Massenspektrometer zugeführt wurden.

3.7.2 Elektrospray-Ionisierung

Der erste Teil des Massenspektrometers selber ist die Ionenquelle. Dieser Schritt wird benötigt, um die Peptide zum einen weiter im ionisierten Zustand zu halten. Zum anderen dient er dazu, diese Ionen in die Gasphase zu überführen und sie so den nächsten Schritten der Messung zugänglich zu machen.

Bei den Untersuchungen dieser Arbeit wurde die Methode der Elektrospray-Ionisierung (ESI) verwendet. Die Peptidmischungen wurden hierbei durch die Spitze der Kapillare, in der sich die C₁₈-Säule befand, geleitet. Dies geschah in einem elektrischen Feld. Über dieses elektrische Feld wurden die Peptide in das Massenspektrometer hineingeleitet. Das Resultat dieses Schrittes war ein Ionengas, welches anschließend dem Analysator zugeführt wurde.

3.7.3 Full Scan in der Orbitrap

Die im vorherigen Schritt erzeugten Ionen wurden nun massenspektrometrisch analysiert. Es handelte sich hier um eine Tandem-Massenspektrometrie. Dies bedeutet, dass zwei Analysemethoden hintereinandergeschaltet wurden.

In einer linearen Ionenfalle erfolgte eine Speicherung der Ionen. Sie wurden so für die Detektion in der Orbitrap portioniert. Über eine zweite Ionenfalle, die sogenannte C-Trap, wurden anschließend die Ionen in die Orbitrap geleitet. In der Orbitrap kreisten die Ionen um eine Elektrode. Diese Oszillationen wurden erfasst. Die Frequenz dieser Zirkulationen war dabei proportional zum Masse-Ladungs-Verhältnis der Ionen. Hierdurch erfolgte die erste Messung der Peptidionen, der sogenannte Full Scan.

Anhand des Full Scans fand nun eine Selektion der zehn Ionen mit der höchsten Intensität statt.

3.7.4 Analyse durch kollisionsinduzierte Dissoziation

Dieser Schritt folgte zeitlich anschließend an den vorherigen Schritt mit der nächsten Portion an Peptidionen, die aus der Ionenquelle kamen. Diese waren der vorherigen Portion sehr ähnlich, sodass die Informationen aus dem Full Scan als Basis für diesen Schritt genommen werden konnten.

Die zehn Ionen mit der höchsten Intensivität aus der Orbitrap-Messung wurden in der linearen Ionenfalle durch Anlegen einer Spannung vom Ionenstrom abgeleitet. Dann wurden sie mittels kollisionsinduzierter Dissoziation (CID, für engl. collision-induced dissociation) in kleinere Bausteine fragmentiert. Es folgte nun ein zweiter Scan dieser aus den zehn ausgewählten Peptidionen entstandenen Fragmente (MS/MS-Analyse), was der Erhöhung der Messgenauigkeit diente.

3.8 Datenanalyse

In diesem Kapitel sind die statistischen Verfahren aufgeführt, mit Hilfe welcher die akquirierten Daten ausgewertet und dargestellt wurden. Außerdem wird die LFQ-Intensität, die maßgeblich erhobene Größe bei den massenspektrometrischen Versuchen, erläutert.

3.8.1 Auswertung der MS-Daten

Die erste Verarbeitung der massenspektrometrisch gemessenen Daten erfolgte mit der Software MaxQuant (Version 1.5.3.30, Computational Systems Biochemistry, max planck institute of biochemistry, Munich, Prof. Jürgen Cox). Nachgeschaltet war zur Auswertung und Visualisierung dieser Daten die Software Perseus (Version 1.5.1.6, Computational Systems Biochemistry, max planck institute of biochemistry, Munich, Prof. Jürgen Cox), mit welcher eine erste Analyse durchgeführt wurde. Weitere Bearbeitungen der Daten erfolgten mit Microsoft Excel 2013.

3.8.2 LFQ-Intensität

Die maßgebliche Größe, mit der eine quantitative Aussage über die in einer Probe enthaltene Proteinmenge getroffen wird, ist die LFQ-Intensität (LFQ, für engl. label free quan-

tification; dt. unmarkierte Quantifizierung). Sie ist das Endergebnis der massenspektrometrischen Messungen. Die LFQ-Intensität ist eine einheitslose Maßzahl für die im Massenspektrometer gemessenen Proteinsignale. Aus den LFQ-Werten der einzelnen Proben wurden die für die Auswertung maßgeblichen relativen Veränderungen der verschiedenen Proteine berechnet. Die LFQ-Intensität kann nur im Vergleich zweier Proben interpretiert werden. Es handelt sich somit um eine relative Größe.

3.8.3 Statistik

Um eine Aussage über Unterschiede im Proteom zwischen den verschiedenen Gruppen (In Vivo: STEMI, CTRL; In Vitro: ATP, LPS, ATP/ LPS, CTRL) treffen zu können, wurden Kriterien definiert, anhand derer man auf eine Erhöhung oder Erniedrigung eines Proteins in den stimulierten Proben bzw. in den STEMI-Proben im Gegensatz zu den Kontrollen schließen konnte. Der Cut-off wurde bei 1,5-facher Erhöhung ($\pm 150\%$) oder bei 1,5-facher Erniedrigung ($\pm 67\%$) gesetzt (vgl. Lang et al. 2017).

Um den Signifikanzwert zu bestimmen, wurde der Student's t-Test für die jeweiligen Triplikate durchgeführt und ein Signifikanzniveau von $\leq 0,05$ gefordert.

Visualisiert wurden die Ergebnisse bezüglich dieser statistischen Auswahlkriterien in einem sogenannten „Volcano Plot“. Dort wurden die relativen Veränderungen gegen die Signifikanzwerte aufgetragen. Auf der x-Achse wurde dabei der Fold Change zur besseren Visualisierung als $\text{Log}[2]$ aufgetragen. Auf der y-Achse wurde der $-\text{Log}[10]$ des p-Wertes aufgeführt. Die Darstellung des p-Wertes als $-\text{Log}[10]$ diene ebenfalls der besseren Interpretierbarkeit. Mit gestrichelten Hilfslinien (x-Achse: $\text{Log}[2](\text{Protein ratio STEMI/ Ctrl}) = \pm 0,58$; y-Achse: $-\log[10](\text{p-Wert}) = 1,3$) wurden diejenigen Proteine separiert, welche die oben genannten Kriterien für einen statistisch signifikanten Fold Change erfüllten.

Bei den massenspektrometrischen Messungen wurde jeweils nur eine geringe Anzahl an Proteinen detektiert, die den oben beschriebenen Kriterien entsprachen. Um gesamtproteomische Aussagen bezüglich der regulierten Proteine treffen zu können, insbesondere bezüglich ihrer Zugehörigkeiten zu verschiedenen biologischen Prozessen, wurde ein statistisches Vorgehen gewählt, mit dem eine größere Anzahl an regulierten Proteinen eingeschlossen werden konnte. Hierzu wurden zunächst die Proteine herausgefiltert, welche in jeder der zugehörigen Proben detektiert wurden. Anschließend wurden die Mittelwerte

gebildet und die Standardabweichung bei jedem Protein innerhalb einer Gruppe berechnet ($\sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{(n-1)}}$; \bar{x} =Stichprobenmittelwert, n = Stichprobenumfang). In die Analyse wurden dann alle Proteine eingeschlossen, bei welchen die Standardabweichung kleiner als die Hälfte des Mittelwertes war. Als Cut-off wurde ein Fold Change von 1,2 (gerundet auf eine Dezimalstelle) gewählt. Anmerkung: Einige Proteine, die in der t-Test-Analyse (s.o.) als signifikant gemessen wurden, passierten dieses Verfahren nicht, weil sie nicht in allen Proben detektiert wurden. Diese wurden ebenfalls in die gesamtproteomischen Analysen mit eingeschlossen.

3.8.4 Gene Ontology-Analyse

Die Gene Ontology („GO“-)Plattform (<http://geneontology.org/>) bietet eine Möglichkeit, Genen und deren Proteinprodukten einheitlich benannte Eigenschaften und Zugehörigkeiten zuzuordnen (Ashburner et al. 2000). Es handelt sich um eine internationale Initiative zur Vereinheitlichung dieser Gen- und Proteininformationen. Die Plattform unterliegt einem ständigen Wandel und wird täglich durch neue Erkenntnisse aktualisiert.

Die Gene Ontology enthält drei Kategorien, zu denen Informationen über Gene oder Geneprodukte bereitgestellt werden. In jeder Kategorie gibt es eine Vielzahl von Termen (sogenannte „GO-Terme“), die einem Gen und seinem Produkt zugeordnet werden. Unter „Biologischer Prozess“ wird die biologische Funktion kategorisiert. Dazu gehören zum Beispiel Stoffwechselwege, zellbiologische Prozesse und die Involvierung in Krankheiten. Die „Molekulare Funktion“ enthält Informationen über die biochemische Aktivität eines Proteins. Unter „Zelluläre Komponente“ finden sich Informationen darüber, an welchem Ort der eukaryotischen Zelle ein Protein zu finden ist (Ashburner et al. 2000).

Bei der Analyse der detektierten Proteine im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden in den Kategorien „Zelluläre Komponente“ und „Biologischer Prozess“ relevante GO-Terme definiert. Anschließend wurden die Proteine auf ihre Zugehörigkeit zu diesen Kategorien hin untersucht.

In der Kategorie „Zelluläre Komponente“ wurde zwischen den Kategorien „Nukleus“, „Zytoplasma“, „Plasmamembran“ und „Extrazellularraum“ unterschieden. In der Kategorie „Biologischer Prozess“ wurden die Proteine auf ihre Zugehörigkeit zu den Go-Termini „Zytoskelett“, „Oxidativer Stress“, „Homöostase“, „ Zelldifferenzierung“, „Zellmig-

ration”, „Verteidigung”, „Apoptose”, „Zelladhäsion”, „Zellproliferation”, „Zellwachstum”, „Zellaktivierung”, „Immunantwort”, „Translation”, „Proteintransport”, „Stimulusantwort” und „Zellkommunikation” hin untersucht.

3.8.5 Proteom-Analysetool „GOrilla“

Um hoch- oder herunterregulierte Stoffwechselwege zu identifizieren wurde das GOrilla-Programm (GOrilla, für engl. Gene Ontology enRICHment anaLysis and visuaLization tool; (Eden et al. 2009)) zur Hilfe genommen. Hoch- und herunterregulierte Gene ließen sich damit einer Referenzliste von Genen gegenüberstellen. Als Referenz diente bei diesen Analysen die Liste mit allen Proteinen, die beim jeweiligen Versuch detektiert wurden.

Mit diesem Verfahren wurde errechnet, welche Stoffwechselwege im besonderen Maße reguliert waren. Die Ergebnisse konnten in Organigrammen visualisiert werden (Abbildung 12).

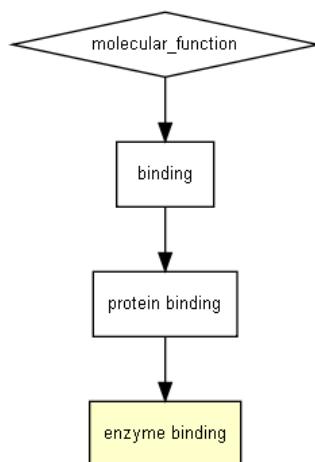


Abbildung 12 Beispiel für ein Ergebnis einer GOrilla-Analyse in der Kategorie „Molekulare Funktion“

4 Ergebnisse

4.1 FACS-Analyse

Die FACS-Analyse diente der Qualitäts- bzw. Reinheitskontrolle nach der Granulozytenisolation. Es wurde dadurch eine zu starke Verunreinigung der Granulozyten durch andere Zellen ausgeschlossen. Diese Analyse wurde mit allen für die massenspektrometrische Analyse verwendeten Proben durchgeführt.

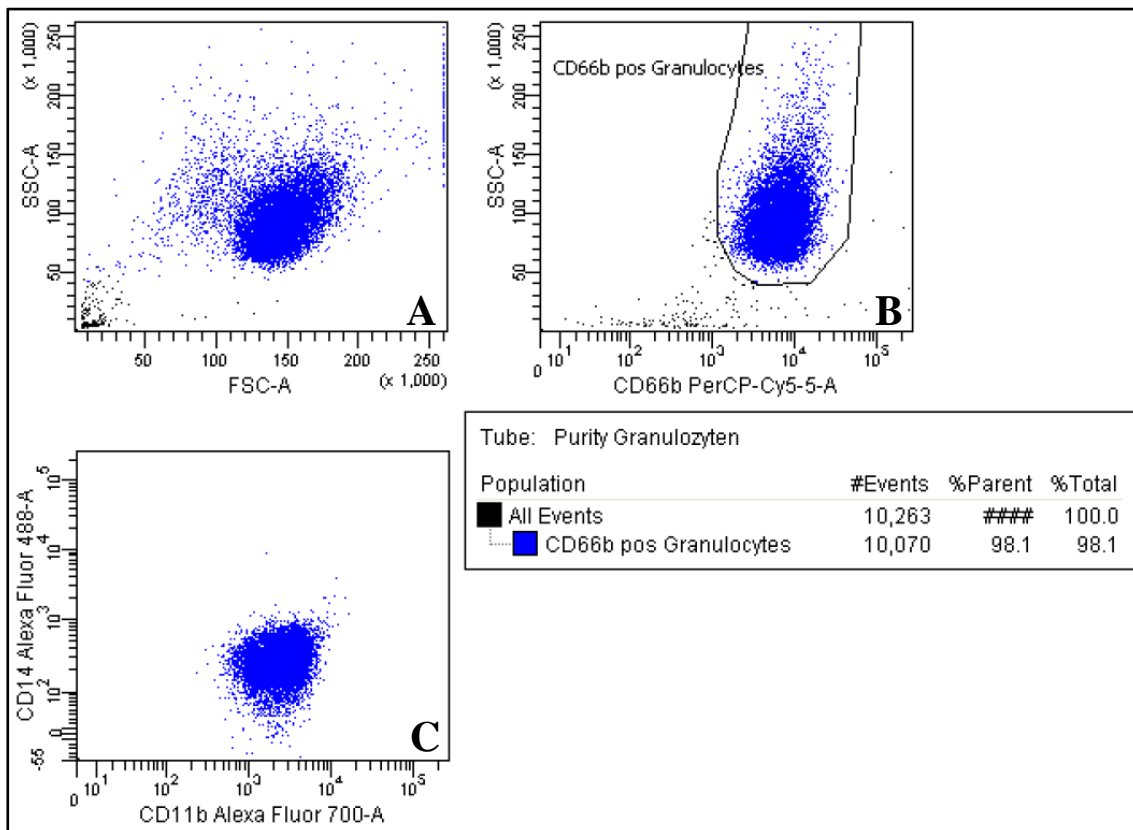


Abbildung 13 Purity-Messung der isolierten Granulozyten. Exemplarisch ist hier Proband A (aus einem der in vitro-Versuche) dargestellt

Im Diagramm A (Abbildung 13) wurden das Seitwärtsstreulicht (SSC, für engl. Side Scatter) und das Vorwärtsstreulicht (FSC, für engl. Forward Scatter) gegeneinander aufgetragen. Das Seitwärtsstreulicht ist ein Maß für die Granularität der analysierten Zellen. Das Vorwärtsstreulicht gibt Hinweise auf die Größe einer Zelle. Es zeigt sich im Diagramm A eine homogene Population von Zellen, die den für Granulozyten typischen Eigenschaften („groß und granulär“) entsprechen.

Im Streulicht-Diagramm B wurde das Seitwärtsstreulicht der CD66b-(PerCp-Cy5.5)-Fluoreszenz gegenübergestellt. CD66b ist ein allgemeiner Granulozytenmarker. Auf den Achsen ist jeweils die Fluoreszenzintensität des entsprechenden Fluoreszenzstoff-konjugierten Antikörpers aufgeführt. Ein Wert über 10^3 gilt dabei als positiv. Wiederum zeigte

sich eine homogene Population von Zellen, die für den Marker CD66b positiv waren. Es zeigte sich eine Zugehörigkeit von 98,1 % aller Zellen zu der identifizierten CD66b-positiven Zellpopulation, was einer hohen Reinheit der isolierten Zellen entspricht.

Die Population aus dem Diagramm B wurde nun noch einmal gesondert mit zwei Antikörpern inkubiert und im FACS gemessen. CD14 ist ein Monozyten- und Makrophagenmarker, während CD11b ein allgemeiner Marker für myeloische Leukozyten ist. Wie im Diagramm C ersichtlich ist, war der überwiegende Teil der Zellen für CD11b positiv, während das Signal für CD14 negativ war. Somit konnte eine Verunreinigung der Zellen mit Monozyten und Makrophagen weitgehend ausgeschlossen werden.

4.2 Proteomische Analyse neutrophiler Granulozyten von STEMI-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen

Von drei STEMI-Patienten und drei gesunden Kontrollen wurden nach beschriebener Methodik neutrophile Granulozyten isoliert und anschließend eine massenspektrometrische Messung durchgeführt.

Insgesamt erfolgte die Identifizierung von 2238 verschiedenen Proteinen. Mittels bioinformatischer Analyse wurden zunächst typische prozessbedingte Kontaminanten herausgefiltert. Beispielsweise ist Keratin als Hautbestandteil ein solcher typischer Kontaminant, der im Rahmen der Probenbearbeitung leicht in die Proben gelangen kann. Auf diese Weise wurden die Proteine auf eine Anzahl von 2059 reduziert.

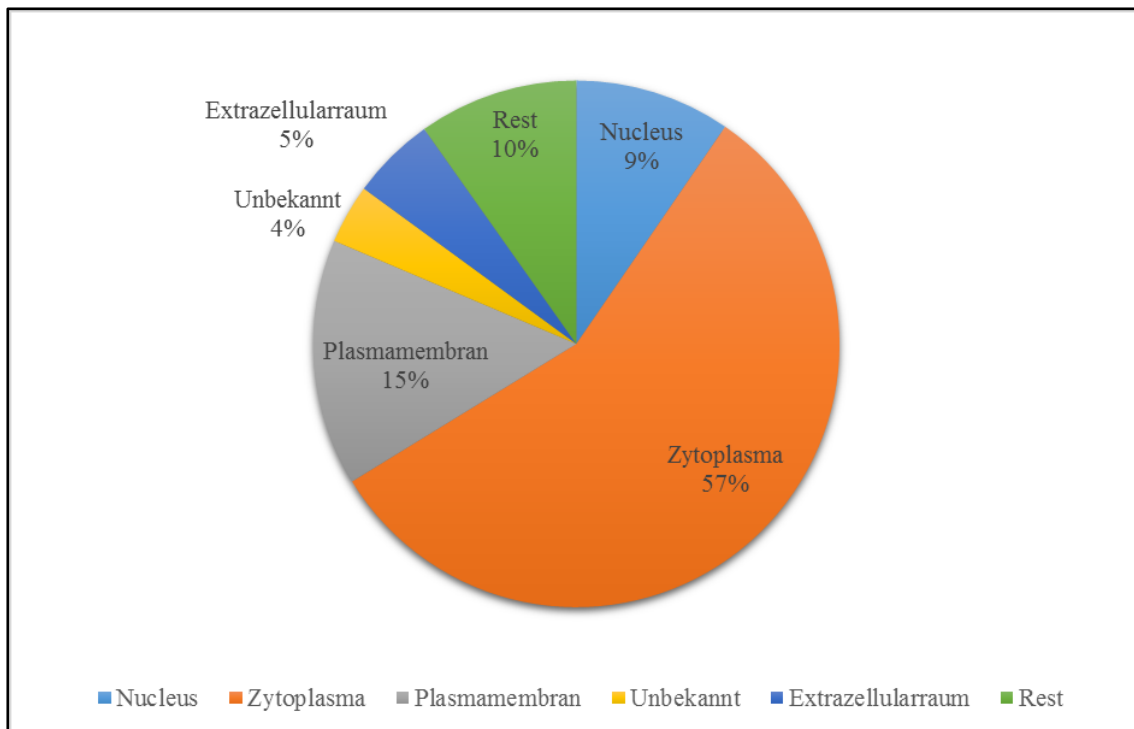


Abbildung 14 Aufteilung der identifizierten Proteine nach ihrer Zugehörigkeit zu den Zellkompartimenten mittels Gene Ontology-Analyse. Mit Rest bezeichnet ist der Anteil an Proteinen, der nicht mit den Go-Termini „Nucleus“, „Zytosol“, „Plasmamembran“ oder „Extrazellularraum“ versehen ist. „Unbekannt“ bedeutet, dass eine Zuordnung durch die GOCC-Datenbank nicht vorliegt

Mit 57 % entstammten die meisten der identifizierten Proteine dem Zytoplasma, gefolgt von plasmamembranären Proteinen (15 %) und dem Zellkern zugeordneten Proteinen (9 %). Dem Extrazellularraum wurden mit 5 % die wenigsten Proteine zugeordnet (Abbildung 14).

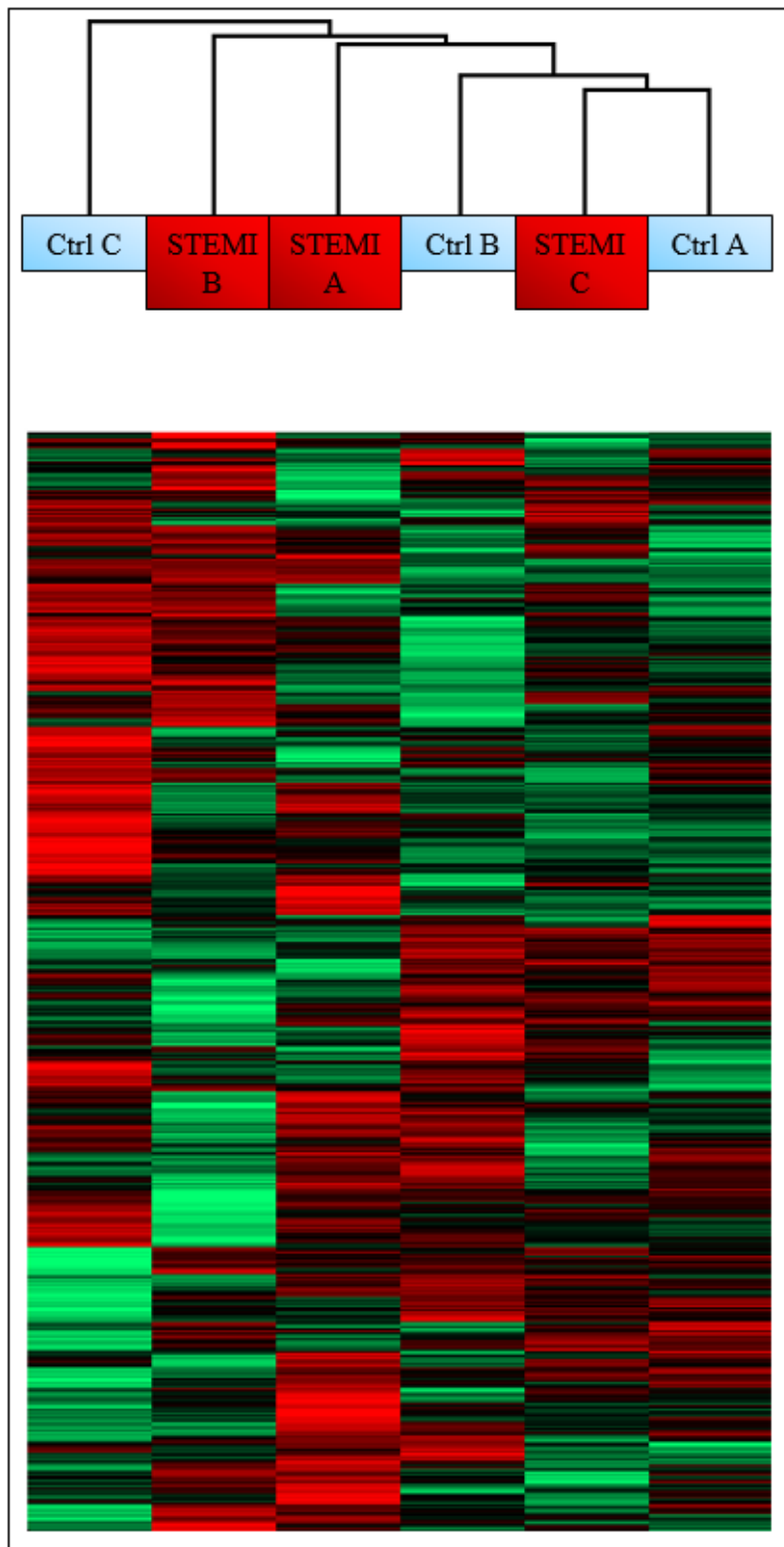


Abbildung 15 Hierarchische Clusteranalyse und Dendrogramm

Zur hierarchischen Clusteranalyse (Abbildung 15) wurden zunächst alle Proteine herausgefiltert, zu denen in jeder der sechs Proben Peptide detektiert wurden. Somit reduzierte sich die Anzahl von 2059 auf 758 Proteine. Anschließend wurde eine z-Transformation vorgenommen. Dadurch werden die Werte der Proben durch ihre Abweichung im Produkt

der Standardabweichungen vom Mittelwert angegeben (Weiß 2013). Anschließend wurden die Ergebnisse visualisiert. Rot bedeutet dabei einen hohen z-Wert (positive Abweichung vom Mittelwert), während grün einen niedrigen z-Wert (negative Abweichung vom Mittelwert) und schwarz z-Werte um null (Werte nahe dem Mittelwert) bedeutet. So ließen sich optisch die Detektionsmuster der Proteome der einzelnen Gruppen miteinander vergleichen. Für das Dendrogramm wurde die Ähnlichkeit der Proteome zwischen den Proben anhand der Clusteranalyse miteinander verglichen. Die einander jeweils ähnlichsten Proben sind dabei nebeneinander anzutreffen und wurden mit Linien verbunden.

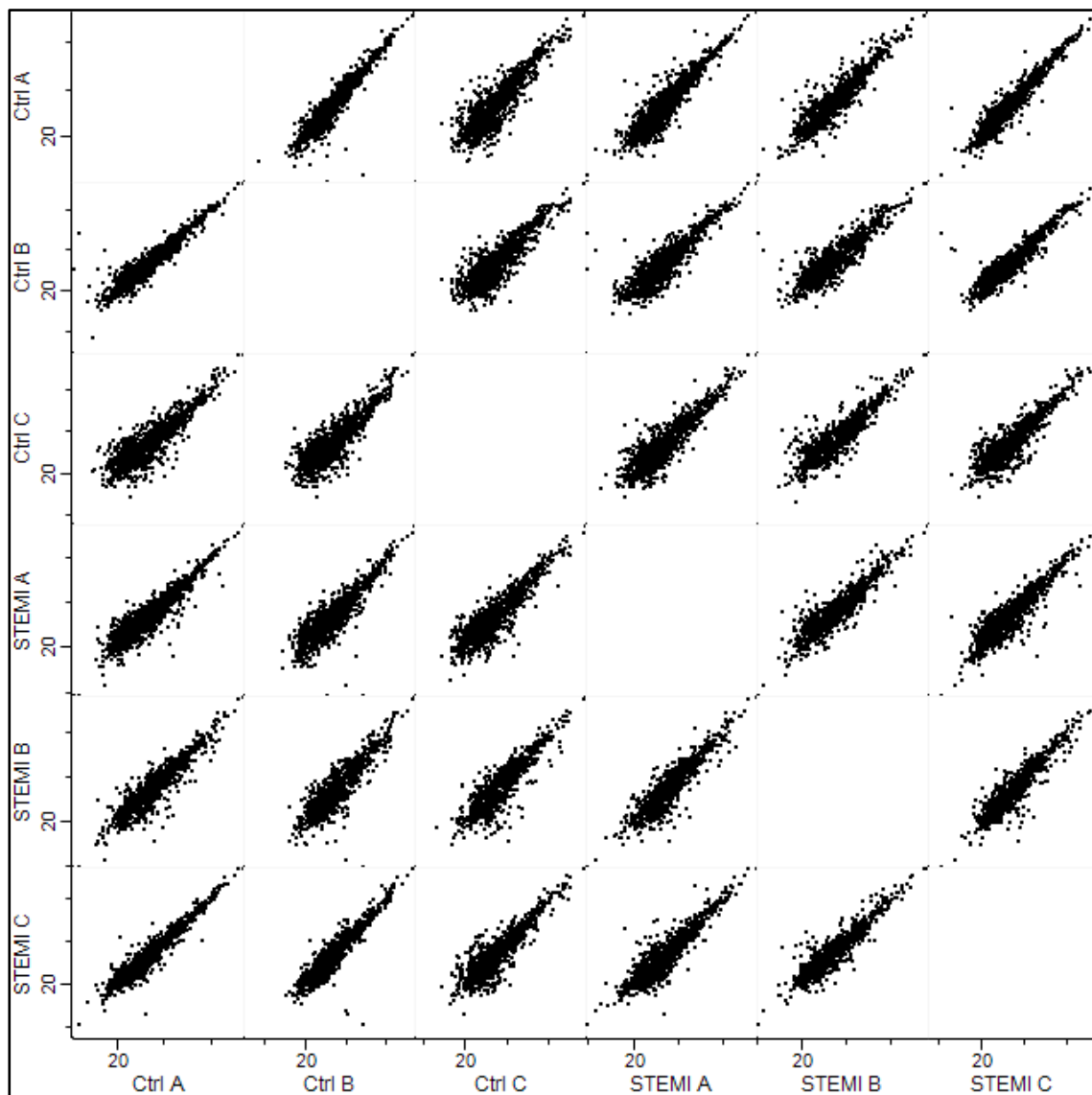


Abbildung 16 Streudiagramm. Übersicht der LFQ-Intensitäten aller Proben (als $\log[2]$). Jede Probe wurde gegen alle anderen Proben aufgetragen. Jeder Punkt entspricht dabei einem detektierten Protein

In den Streudiagrammen (Abbildung 16) wurden alle Proben einander gegenübergestellt. Bei größeren proteomischen Unterschieden zwischen zwei Proben entstanden Wolken,

die von der $x=y$ -Geraden deutlich abwichen und somit eine dickbäuchige Form annahmen. Eine derartige Wolke ist beispielsweise in der Gegenüberstellung von Kontrolle C und Kontrolle B zu beobachten. Schmale, einer gedachten $x=y$ -Geraden anliegende Kurven lagen vor bei geringen proteomischen Unterschieden zwischen zwei Proben. Kontrolle A und Kontrolle B sind für diesen Fall ein geeignetes Beispiel.

Die hierarchische Clusteranalyse, das Dendrogramm (Abbildung 15) und die Streudiagramme (Abbildung 16) dienten dem Gesamtvergleich der Proteome zwischen den Proben. Im Dendrogramm ist ersichtlich, dass die größte Ähnlichkeit zwischen Kontrolle A und STEMI C herrschte. Der größte Unterschied bestand zwischen den Proteomen von Kontrolle A und Kontrolle C. Bestätigt wird dies im Streudiagramm (Abbildung 16). Dort erscheint beim Vergleich von Kontrolle A und STEMI C eine sehr schmale Wolke. Die detektierten Proteine wurden also in sehr ähnlichen Konzentrationen gemessen im Vergleich der beiden Proben. Betrachtet man auch hier die Gegenüberstellung von Kontrolle A und Kontrolle C, lässt sich eine breite Wolke erkennen. Die Proteine wurden also im Vergleich dieser beiden Proben sehr unterschiedlich intensiv detektiert, was einer hohen relativen Veränderung bei vielen Proteinen entspricht.

Es lag also insgesamt keine Gruppierung der Proben zwischen STEMIs und gesunden Kontrollen vor. Die Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen den Proteomen waren nicht spezifisch für die Gruppierung. Vielmehr herrschten interindividuelle proteomische Unterschiede vor, die von der Pathologie des STEMIs unabhängig waren.

4.2.1 Regulierte Proteine

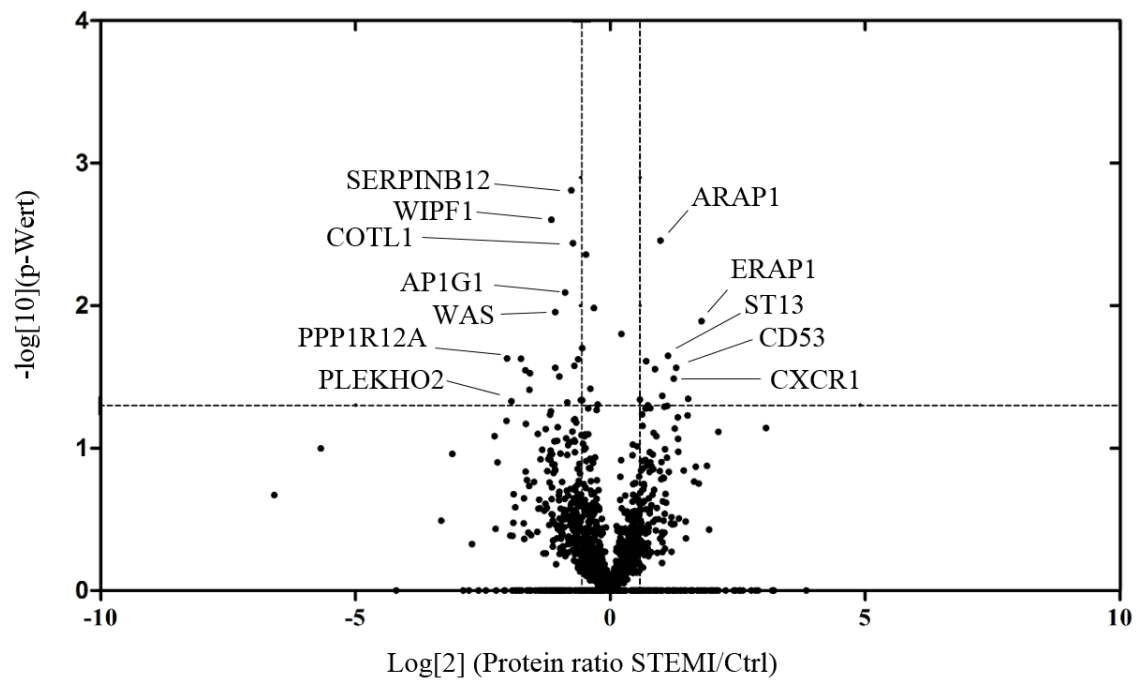


Abbildung 17 Volcano Plot. Detektierte Proteine bei STEMI-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen

Insgesamt wurden 2059 Proteine identifiziert (Abbildung 17).

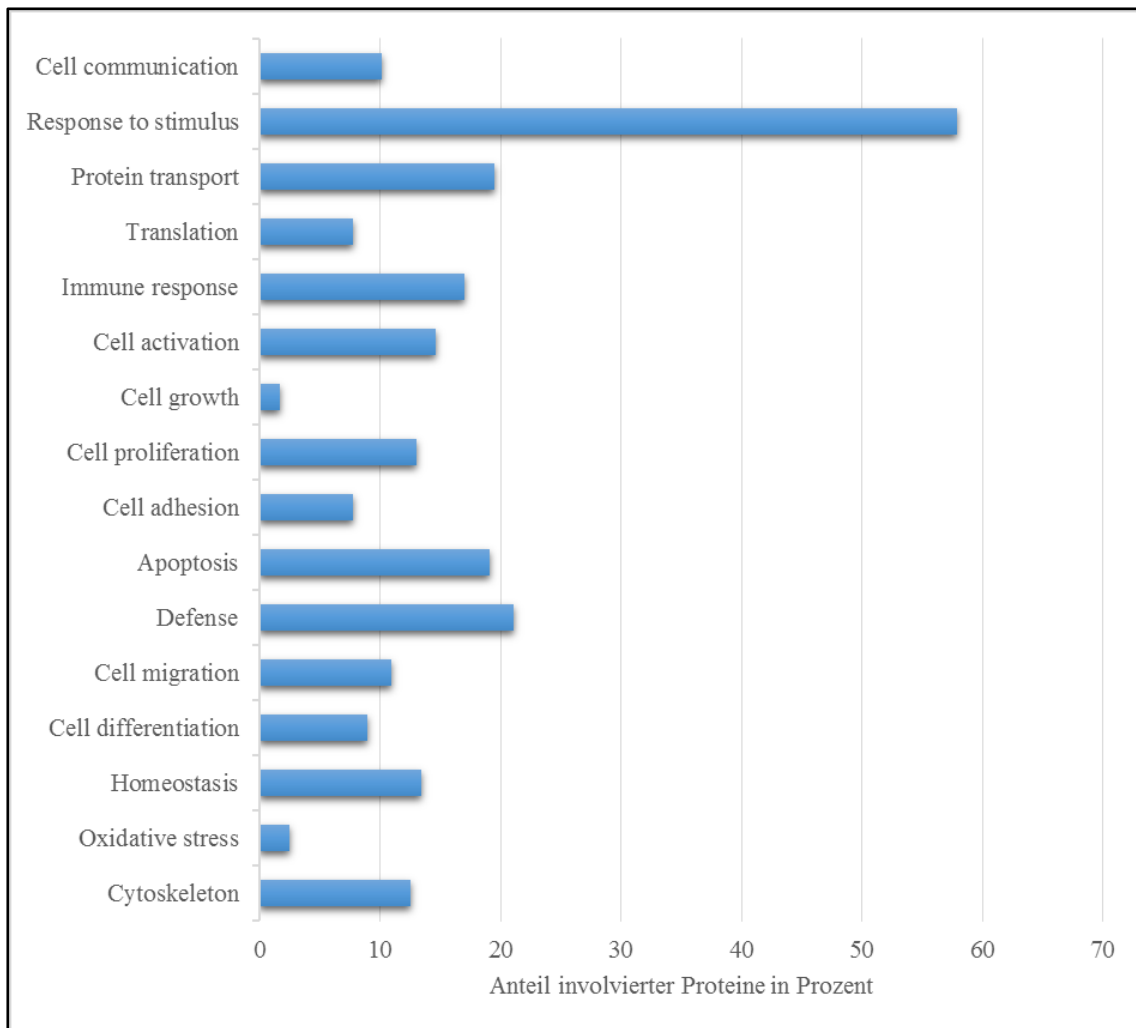


Abbildung 18 Anteil an detektierten Proteinen, der dem jeweiligen biologischen Prozess zugeordnet ist. Die Zuordnung erfolgte anhand der Gene Ontology-Datenbank

Die regulierten Proteine (sowohl hoch- als auch herunterreguliert) wurden bezüglich der Zugehörigkeit zu verschiedenen biologischen Prozessen hin analysiert (Abbildung 18). Fast 60 % der regulierten Proteine sind an der Stimulusantwort beteiligt. Weiterhin stark repräsentiert sind Proteintransport, Immunantwort, Apoptose und Immunabwehr.

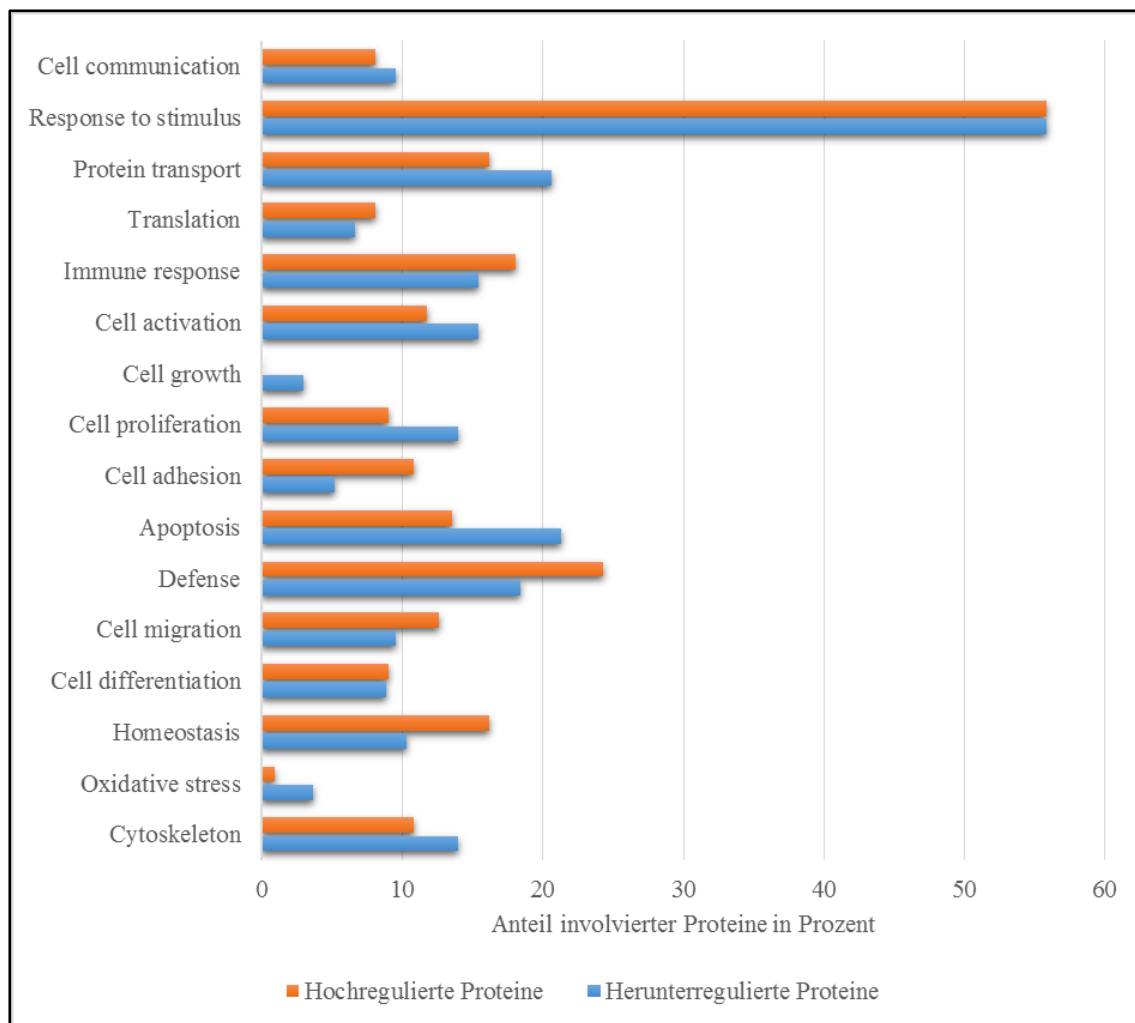


Abbildung 19 Anteil an detektierten Proteinen, der dem jeweiligen biologischen Prozess zugeordnet ist. Aufgeführt sind hoch- und herunterregulierte Proteine im Vergleich. Die Zuordnung erfolgte anhand der Gene Ontology-Datenbank

Die vertretenen biologischen Prozesse durch hoch- und herunterregulierte Proteine wurden ins Verhältnis zueinander gestellt (Abbildung 19). Bei den meisten biologischen Prozessen zeigen sich ähnliche Prozentsätze bei beiden Gruppen. Den Kategorien Homöostase, Immunabwehr und Zelladhäsion wurden unter den hochregulierten Proteinen deutlich mehr Proteine zugeordnet. Den Kategorien Apoptose und Zellproliferation wurden prozentual deutlich mehr von den herunterregulierten Proteinen zugeordnet.

4.2.2 Bei STEMI-Granulozyten erhöht gemessene Proteine

In Granulozyten von STEMI-Patienten konnten im Vergleich zu gesunden Probanden insgesamt 16 signifikant mindestens 1,5-fach erhöhte Proteine detektiert werden (Tabelle 6).

Proteinname	Genname	Relative Veränderung
Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1	ERAP1	3.5
60S acidic ribosomal protein P0	RPLP0	2.9
Leukocyte surface antigen CD53	CD53	2.4
C-X-C chemokine receptor type 1	CXCR1	2.4
Hsc70-interacting protein	ST13	2.2
Dipeptidyl peptidase 3	DPP3	2.2
Alpha-1B-glycoprotein	A1BG	2.1
Protein canopy homolog 3	CNPY3	2
Arf-GAP with Rho-GAP domain	ARAP1	2
NAD-dependent malic enzyme, mitochondrial	ME2	1.8
Annexin A5;Annexin	ANXA5	1.7
Heme-binding protein 2	HEBP2	1.7
Importin subunit beta-1	KPNB1	1.6
Syntenin-1	SDCBP	1.6
Solute carrier family 15 member 4	SLC15A4	1.6
14-3-3 protein zeta/delta	YWHAZ	1.5

Tabelle 6 Signifikant erhöht gemessene Proteine bei STEMI-Granulozyten

Es handelte sich bei den Proteinen, die in den STEMI-Proben mit mindestens 1,5-fach erhöhter Intensität gemessen wurden, um eine sehr heterogene Gruppe. So ließen sich mit einer Analysesoftware (GORilla) keine Tendenzen zu bestimmten GeneOntology-Kategorien herausfiltern.

Mit einer relativen Veränderung von 3,46 ist die „Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1“ (ERAP1) am stärksten erhöht nachgewiesen worden. Es handelt sich dabei um eine Aminopeptidase, welche im Endoplasmatischen Retikulum Proteine zerteilt und sie somit für die Präsentation auf MHC-1-Molekülen präpariert (Magrane and Uniprot Consortium 2011).

Das „Leukocyte surface antigen CD53“ (CD53) ist 2,44-fach erhöht detektiert worden. Es wird auf allen Leukozyten exprimiert und gehört zur Familie der Tetraspanin-Transmembranproteine. Bei aktivierten neutrophilen Granulozyten wurde eine Herunterregulierung des CD53-Oberflächenantigens beschrieben (Mollinedo et al. 1998). Eine erhöhte Expression von CD53 wurde dem hingegen auf apoptotischen neutrophilen Granulozyten beobachtet (Beinert et al. 2000).

2,36-fach erhöht fand sich der „C-X-C chemokine receptor type 1“ (CXCR1). Es handelt sich um einen vor allem auf neutrophilen Granulozyten und Makrophagen exprimierten Rezeptor, der als Bindungsstelle für „Interleukin-8“ (IL-8) fungiert. Durch die Bindung

von IL-8 an diesen Rezeptor wird über eine G-Protein-assoziierte Kaskade der neutrophile Granulozyt aktiviert. In Kombination mit seinem Liganden IL-8 ist der CXCR1 somit unentbehrlich für die akute Inflamationsreaktion und die Antwort des angeborenen Immunsystems (Murphy et al. 2000).

Bei „Alpha-1B-glycoprotein“ (A1BG) handelt es sich um ein Protein aus dem Blutplasma, dessen physiologische und pathophysiologische Rolle unbekannt ist. Es wurde im Blutplasma von Herzinfarktpatienten bei Krankenhausaufnahme in unveränderter Konzentration, aber am dritten Tag nach Infarkt erniedrigt nachgewiesen (Cubedo et al. 2013).

Ebenfalls erhöht nachgewiesen wurde „Annexin A5“ (ANXA5). Dieses Protein bindet Kalzium und beeinflusst die Blutgerinnung indem es antikoagulierend wirkt. Es ist an vielen weiteren Prozessen, wie der Endo- und Exozytose oder der Inflamationsreaktion, beteiligt (Bouter et al. 2015). Gu et al. (2015) demonstrierten am Mausmodell, dass humanes ANXA5 bei LPS-Endotoxämie protektiv auf Kardiomyozyten wirkt und deren Kontraktilität verbessert (Gu et al. 2015).

„Importin subunit beta-1“ (KPNB1) war mit einer relativen Veränderung von 1,62 mäßig erhöht. In Interaktion mit weiteren Vertretern der Importin-Familie ist es für den Transport von Proteinen zwischen Nucleus und Zytoplasma zuständig (Magrane and Uniprot Consortium 2011). Mithilfe von 2-DE LC-MS/MS wurde es in Jurkat-Zellen (Jurkat-Zellen entstammen einer T-lymphozytären Zellreihe), bei welchen durch Hitzeeinwirkung Apoptose induziert wurde, erniedrigt gemessen (Yuan et al. 2007).

In eben diesem Paper wurde auch das Protein „60S acidic ribosomal protein P0“ (RPLP0) massenspektrometrisch identifiziert. Nach hitzeinduzierter Apoptose von Jurkat-Zellen wurde es hochreguliert detektiert (Yuan et al. 2007). Bei der vorliegenden Arbeit wurde es bei STEMI-Granulozyten 2,88-fach erhöht nachgewiesen. Beim RPLP0 handelt es sich um einen Teil der ribosomalen 60S-Untereinheit. Es ist somit in translatorische Prozesse involviert (Magrane and Uniprot Consortium 2011).

Das „Heme-binding protein 2“ (HEPB2) wurde 1,66-fach erhöht detektiert. Über seine physiologischen Funktionen ist bisher wenig bekannt. Es wurde in Zusammenhang gebracht mit Prozessen des programmierten und unprogrammierten Zelluntergangs. In apoptotischen Zellen wurde durch eine erhöhte Konzentration von HEPB2 eine vermehrte Durchlässigkeit der mitochondrialen Membranen (engl.: „mitochondrial permeability transition“) beobachtet. Mitochondrial permeability transition wird als Teilmechanismus von Apoptose- und Nekrosereaktionen angesehen (Szigei et al. 2006).

Mit einem Fold Change von 2,02 wurde das „Protein canopy homolog 3“ (CNPY3) detektiert. Liu et al. (2010) demonstrierten, dass es sich um ein Co-Chaperon handelt, welches für die korrekte Faltung der meisten Toll-Like-Rezeptoren unabdingbar ist (Liu et al. 2010). Es ist somit Teil der angeborenen und erworbenen Immunität (Magrane and Uniprot Consortium 2011).

4.2.3 Bei STEMI-Granulozyten erniedrigt gemessene Proteine

In Tabelle 7 sind die erniedrigt detektierten Proteine aufgelistet.

Proteinname	Genname	Relative Veränderung
Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A	PPP1R12A	0.2
Pleckstrin homology domain-containing family O member 2	PLEKHO2	0.3
Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	ALDH2	0.3
Proteasome subunit alpha type-5	PSMA5	0.3
Thioredoxin-related transmembrane protein 1	TMX1	0.3
Calpastatin	CAST	0.3
Reticulon-3	RTN3	0.4
WAS/WASL-interacting protein family member 1	WIPF1	0.4
Wiskott-Aldrich syndrome protein	WAS	0.5
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5	NUDT21	0.5
Ras-related protein Ral-A	RALA	0.5
AP-1 complex subunit gamma-1	AP1G1	0.5
Vesicle-fusing ATPase	NSF	0.6
Serpin B12	SERPINB12	0.6
Coactosin-like protein	COTL1	0.6
Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 3	MAP2K3	0.6
Glutaredoxin-1	GLRX	0.6
Chromobox protein homolog 3	CBX3	0.7

Tabelle 7 Signifikant erniedrigte Proteine bei STEMI-Granulozyten

Es erfolgte eine Analyse der 18 signifikant erniedrigten Proteine mittels Analysesoftware. In der Kategorie „Molekulare Funktion“ fanden sich elf Proteine, die mit dem Go-Term „Enzymbindung“ assoziiert waren.

Am stärksten erniedrigt fand sich mit einem Fold Change von 0,25 (\cong 4,07-fach) die „Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A“ (PPP1R12A). Dies ist der Myosin bindende Teil der Myosinphosphatase. Sie partizipiert an mehreren Aktin/ Myosin-assoziierten Prozessen, unter anderem an der Ausbildung des Zytoskelettes (Brown et al. 2015).

Das Protein „Proteasome subunit alpha type-5“ (PSMA5) ist als Teileinheit des Proteasom-Komplexes an vielen proteolytischen Prozessen auf Zellebene beteiligt. So finden sich in der Gene Ontology zu diesem Protein sehr viele biologische Prozesse. Diese stehen beispielsweise in Zusammenhang mit MHC-1-Antigenpräsentierung, Apoptose, Signaltransduktion, Immunantwort, Ubiquitin-Stoffwechselwegen und Mitose (Magrane and Uniprot Consortium 2011).

Fast 3-fach erniedrigt (relative Veränderung: 0,33) wurde das Protein „Calpastatin“ (CAST) detektiert. Seine Funktion in neutrophilen Granulozyten wurde bereits untersucht. Wie Squier et al. (1999) beschreiben, fungiert CAST als Inhibitor der Protease Calpain. Calpain wiederum wird benötigt für die Apoptosereaktion in neutrophilen Granulozyten. Eine Herabregulierung von CAST wurde somit als proapoptotischer Stimulus der Calpain-abhängigen Apoptose identifiziert (Squier et al. 1999).

Ebenfalls erniedrigt gemessen wurden „WAS/WASL-interacting protein family member 1“ (WIPF1, relative Veränderung: 0,45) und „Wiskott-Aldrich syndrome protein“ (WAS, relative Veränderung: 0,47). Diese Proteine interagieren miteinander und spielen eine Rolle in der Ausbildung und Reorganisation des Aktin-Zytoskelettes, der Zellmotilität und weiterer damit in Zusammenhang stehender Prozesse (Magrane and Uniprot Consortium 2011).

„Reticulon-3“ (RTN3) ist zum einen involviert in den Membran-Verkehr zwischen dem Endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat (Wakana et al. 2005). Zum anderen gibt es Hinweise, dass es durch Induktion der Caspase-8-Kaskade proapoptotisch wirkt (Magrane and Uniprot Consortium 2011).

Involviert in den intrazellulären Protein- und Vesikeltransport in Verbindung mit dem Golgi-Apparat sind „AP-1 complex subunit gamma-1“ (AP1G1) und „Vesicle-fusing ATPase“ (NSF). Die NSF ist für den Vesikeltransport zum Golgi-Apparat, etwa ausgehend vom Endoplasmatischen Retikulum, zuständig. Die AP1G1 demgegenüber ist der Golgi-Prozessierung von Proteinen nachgeschaltet (Magrane and Uniprot Consortium 2011).

Ein weiteres erniedrigtes Protein ist das „Pleckstrin homology domain-containing family O member 2“ (PLEKHO2), welches als Teil der „Pleckstrin homology domain“ in die Signaltransduktion involviert ist. Über die genauen Funktionen ist bisher wenig bekannt (Ingleby and Hemmings 1994).

Mit einer relativen Veränderung von 0,30 ist die „Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial“ (ALDH2) mehr als 3-fach erniedrigt nachgewiesen worden. Sie ist Teil der Reaktionskette in der Ethanoldegradation (Magrane and Uniprot Consortium 2011). Die ALDH2 metabolisiert außerdem Nitroglycerin – ein Medikament, welches bei pektanginösen Beschwerden, hypertensiven Entgleisungen und auch oft beim akuten Myokardinfarkt eingesetzt wird. Die ALDH2 zeigt einen Aktivitätsabfall in neutrophilen Granulozyten, nachdem Nitroglycerin appliziert wurde. Im Tiermodell konnte außerdem nachgewiesen werden, dass die ALDH2-Aktivität in ischämischen Herzen mit dem Ischämiebedingten Schaden umgekehrt korreliert (Wenzel et al. 2009, Chen et al. 2008).

4.3 Proteomische Analyse in vitro stimulierter neutrophiler Granulozyten

Nach in Kapitel 3.5 beschriebenem Protokoll wurden von gesunden Probanden neutrophile Granulozyten isoliert und anschließend mit ATP, LPS und deren Kombination stimuliert. Jeder Zellkulturversuch wurde dabei mit drei verschiedenen Probanden durchgeführt, sodass letztendlich zwölf Messungen durchgeführt wurden (jeweils 3x ATP, LPS, ATP/ LPS, Kontrolle).

Eine Gesamtanzahl von 2830 Proteinen wurde identifiziert. Durch die Herausfilterung von Kontaminanten mittels Analysesoftware (vgl. Kapitel 4.2) wurde diese Anzahl auf 2599 Proteine reduziert.

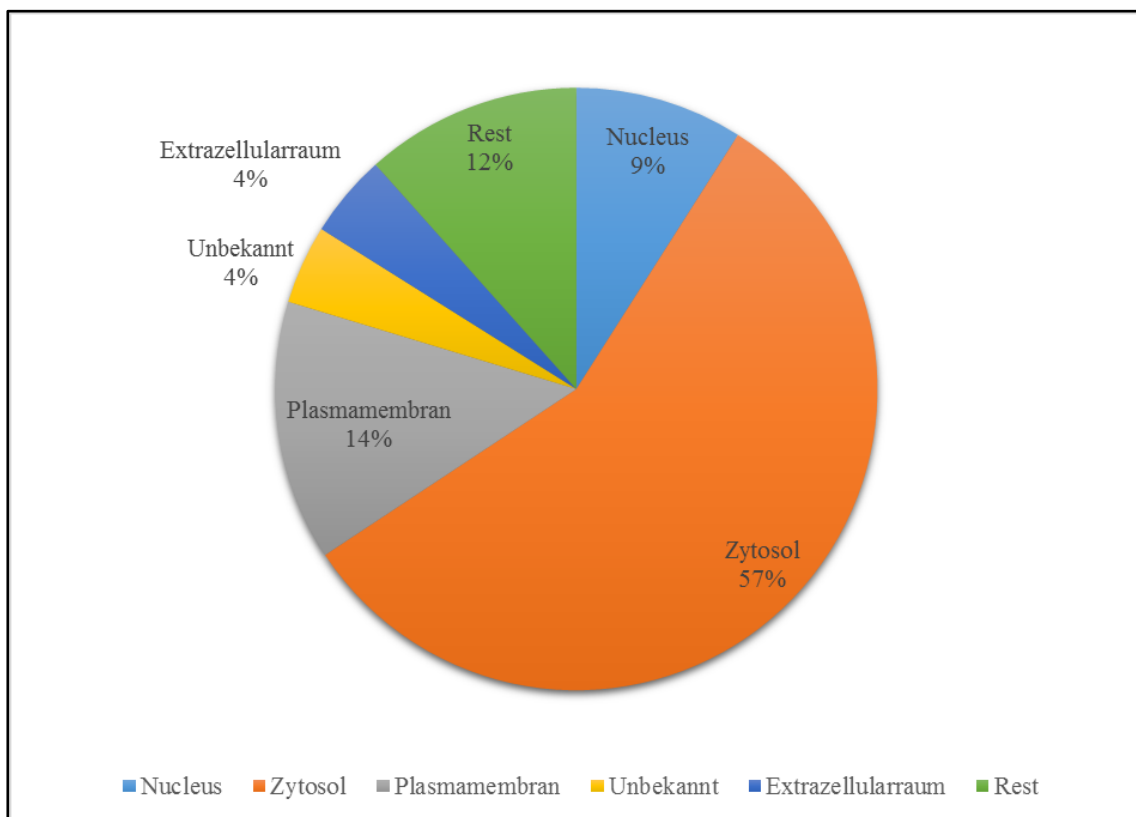


Abbildung 20 Aufteilung der identifizierten Proteine nach ihrer Zugehörigkeit zu den Zellkompartimenten mittels Gene Ontology-Analyse. Mit Rest bezeichnet ist der Anteil an Proteinen, der nicht mit den Go-Termini „Nucleus“, „Zytosol“, „Plasmamembran“ oder „Extrazellularraum“ versehen ist. „Unbekannt“ bedeutet, dass eine Zuordnung durch die GOCC-Datenbank nicht vorliegt

Mehr als die Hälfte der Proteine entstammte dem Zytosol, 14 % der Plasmamembran und 9 % dem Zellkern (Abbildung 20). Es zeigten sich den Ergebnissen der In-vivo-Versuche (Abbildung 14) sehr ähnliche Prozentsätze.

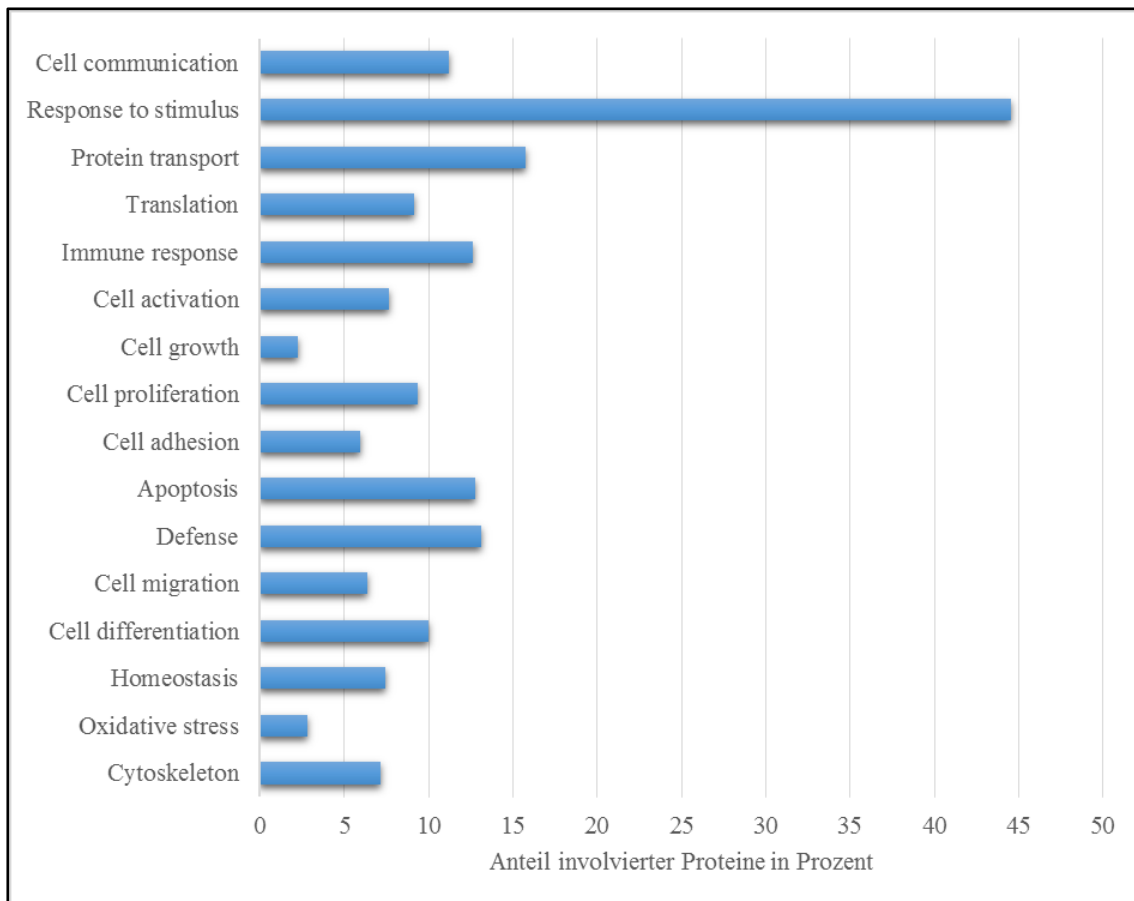


Abbildung 21 Anteil an detektierten Proteinen, der dem jeweiligen biologischen Prozess zugeordnet ist. Die Zuordnung erfolgte anhand der Gene Ontology-Datenbank

Auch bei diesen Versuchen war ein großer Anteil der Proteine an der allgemeinen Stimulusantwort beteiligt (Abbildung 21). Weiterhin waren die Prozesse Proteintransport, Immunantwort, Apoptose und Immunabwehr durch einen prozentualen Anteil von jeweils ca. 15 % der Proteine vertreten.

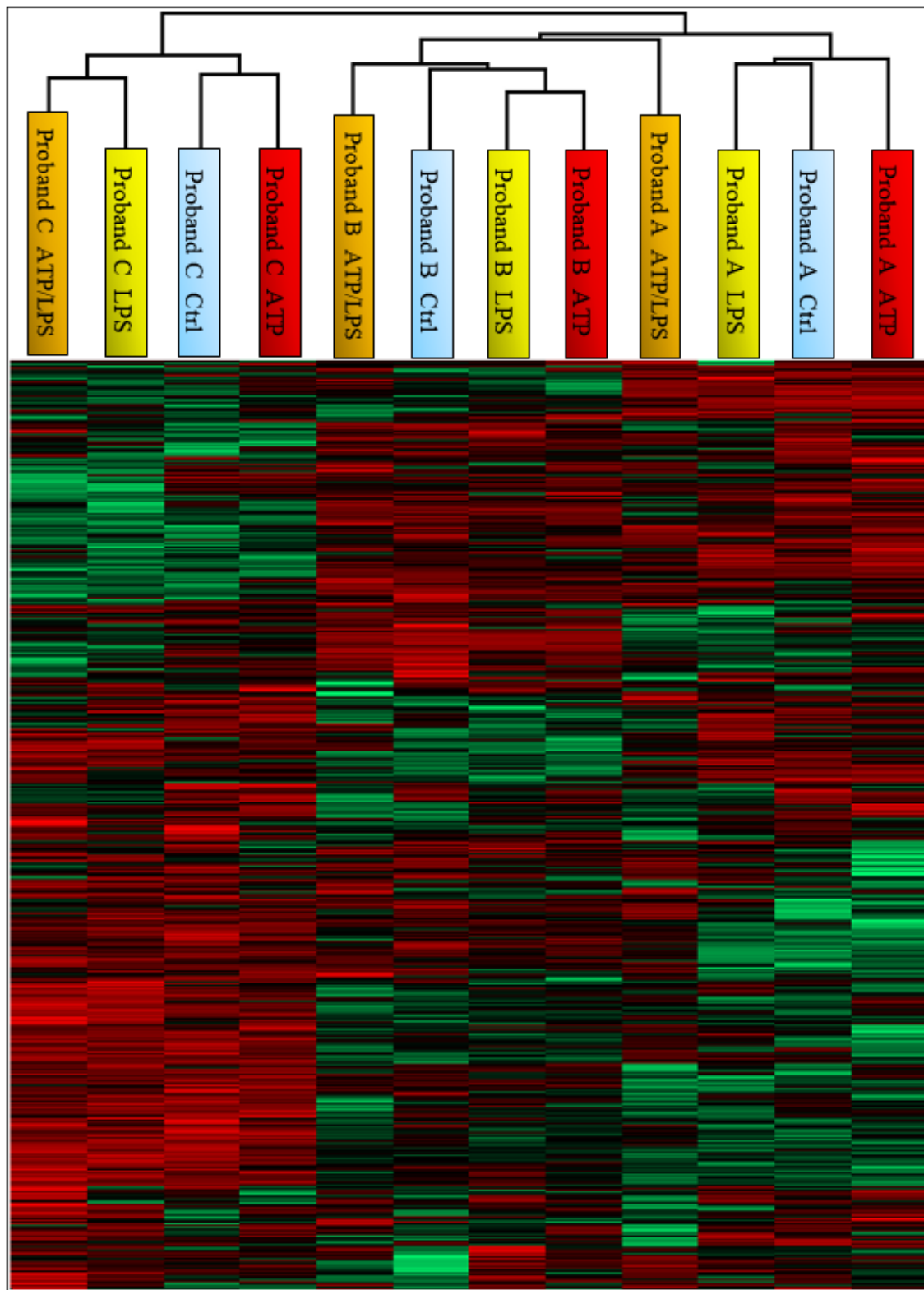


Abbildung 22 Hierarchische Clusteranalyse und Dendrogramm

Es zeigte sich, dass jeweils die zu einem Probanden gehörigen Proben die deutlichsten proteomischen Ähnlichkeiten zueinander aufwiesen (Abbildung 22). Lediglich die ATP/LPS-stimulierte Probe von Proband A bildete dabei eine Ausnahme, da sie dem Proteom von Proband B mehr ähnelte, als den weiteren Proben von Proband A.

Betrachtet man die zu jeweils einem Probanden gehörigen Proteome miteinander, fällt auf, dass die Proteome der ATP-stimulierten Zellen sich von denen der ATP/ LPS-stimulierten Zellen jeweils am meisten unterschieden. Abgesehen von dieser Systematik sind allerdings keine weiteren probenübergreifenden Ähnlichkeiten und Unterschiede zu erkennen.

Insgesamt überwogen also, wie auch bei den vorher beschriebenen in vivo-Versuchen, die interindividuellen proteomischen Unterschiede. Ein Proteomshift auf gesamtproteomischem Niveau erfolgte auch durch die Stimulierung der neutrophilen Granulozyten nicht.

4.3.1 Regulierte Proteine in ATP-stimulierten neutrophilen Granulozyten

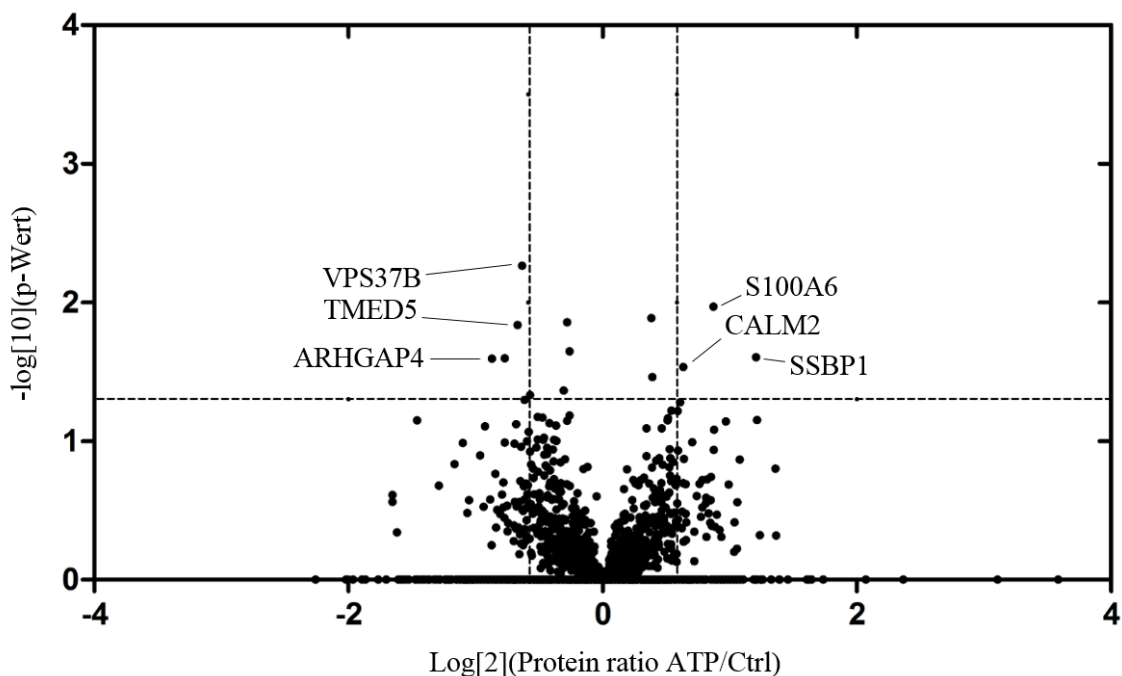


Abbildung 23 Volcano Plot der Proteine bei den ATP-stimulierten neutrophilen Granulozyten

Es fanden sich vier Proteine mit signifikant erhöhter und fünf Proteine mit erniedrigter Intensität (Abbildung 23, Tabelle 8).

Proteinname	Genname	Relative Veränderung
Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial	SSBP1	2.3
Protein S100-A6	S100A6	1.8
Calmodulin	CALM2	1.6
Syntaxin-3	STX3	1.5
Proteasome subunit alpha type-3	PSMA3	0.7
Vacuolar protein sorting-associated protein 37B	VPS37B	0.6
Transmembrane emp24 domain-containing protein 5	TMED5	0.6
Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15	DHX15	0.6
Rho GTPase-activating protein 4	ARHGAP4	0.5

Tabelle 8 Signifikant regulierte Proteine bei den ATP-stimulierten neutrophilen Granulozyten

Es erfolgte eine Analyse der regulierten Proteine bezüglich der durch sie repräsentierten biologischen Prozesse (Abbildung 24).

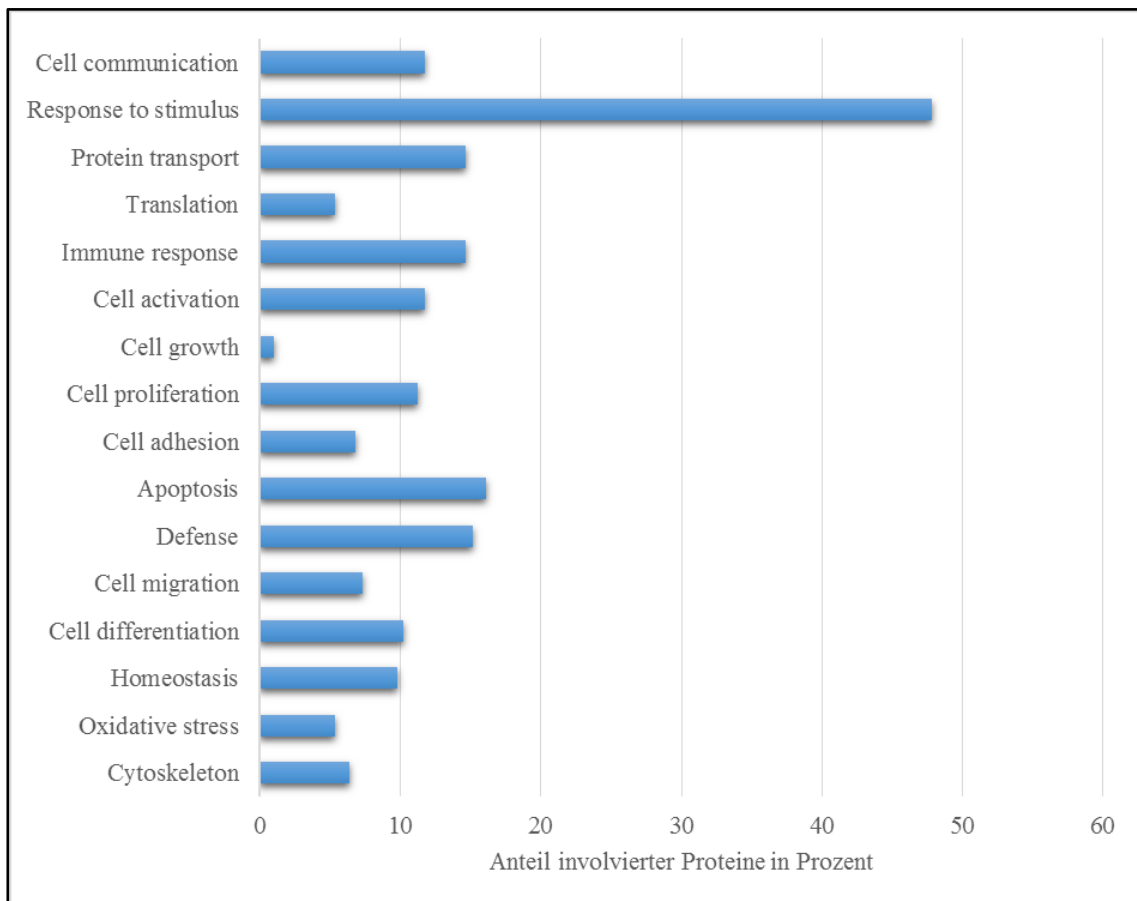


Abbildung 24 Biologische Prozesse der regulierten Proteine bei den ATP-stimulierten neutrophilen Granulozyten

Bei den erhöht gemessenen Proteinen fanden sich Vertreter mit verschiedenen Funktionen. Mit „Protein S100-A6“ (S100A6), „Calmodulin“ (CALM2) und „Syntaxin-3“

(STX3) waren drei der vier Proteine positiv für den biologischen Prozess „Stimulusantwort“. Eine weitere Gruppierung der Proteine zu biologischen Prozessen war nicht möglich.

Das „Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial“ (SSBP1) wurde mit der höchsten relativen Veränderung gemessen. Es spielt eine Rolle in der mitochondrialen DNA-Replikation. Zwei der vier Proteine sind Kalziumbinder: S100A6, welches mit einer relativen Veränderung von 1,8 mit fast doppelter Intensität nachgewiesen wurde, ist an zahlreichen zellbiologischen Prozessen beteiligt. Unter anderem spielt es bei Zell-Zell-Kontakten eine Rolle. Ebenfalls kalziumbindend wirkt CALM, welches unter anderem in viele Prozesse des Immunsystems involviert ist (Magrane and Uniprot Consortium 2011).

Bei den erniedrigten Proteinen ließen sich keine verstärkt repräsentierten biologischen Prozesse herausfiltern. Auch die Analyse mittels Analysesoftware (GORilla) erbrachte keine Ergebnisse.

Es handelte sich um eine heterogene Gruppe. Nennenswert ist das „Proteasome subunit alpha type-3“ (PSMA3), eine Endopeptidase, welche unter anderem in Prozesse wie Zellzyklus, Immunantwort und Apoptose involviert ist. Das Protein „Vacuolar protein sorting-associated protein 37B“ (VPS37B) ist ein Regulator des Vesikeltransportes (Magrane and Uniprot Consortium 2011).

4.3.2 Regulierte Proteine in LPS-stimulierten neutrophilen Granulozyten

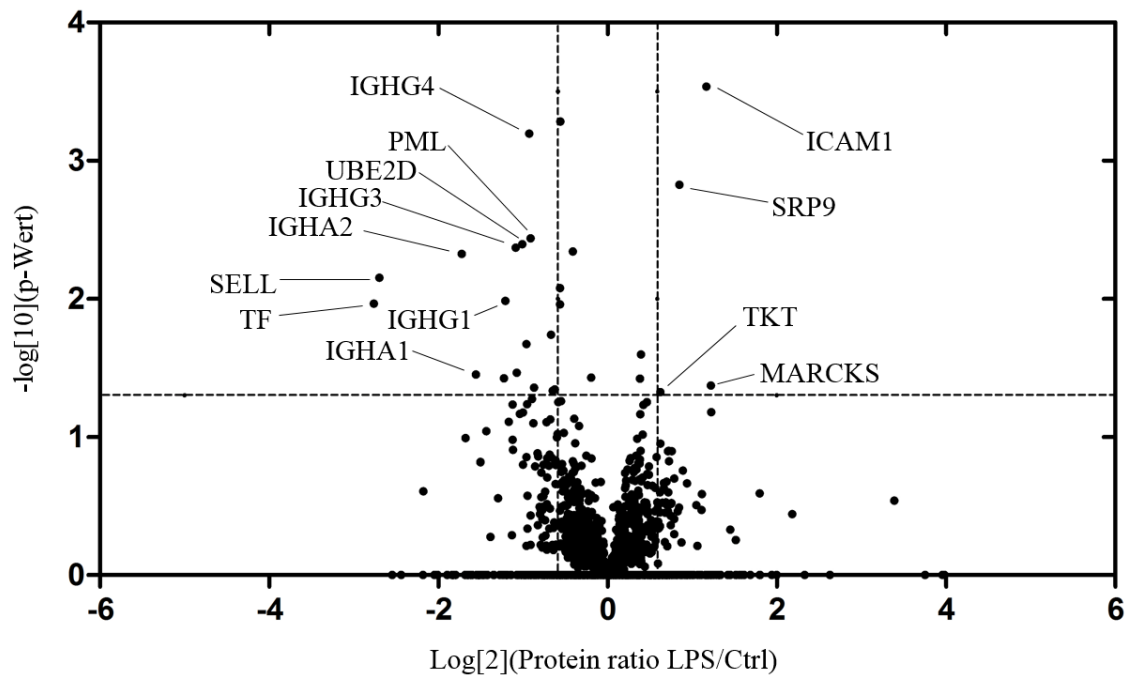


Abbildung 25 Volcano Plot der Proteine bei den LPS-stimulierten neutrophilen Granulozyten

Bei den Stimulationsversuchen mit LPS fanden sich vier mindestens 1,5-fach hochregulierte Proteine und 18 Proteine mit mindestens 1,5-fach erniedrigter Regulation (Abbildung 25, Tabelle 9).

Proteinname	Genname	Relative Veränderung
Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	MARCKS	2.3
Intercellular adhesion molecule 1	ICAM1	2.2
Signal recognition particle 9 kDa protein	SRP9	1.8
Transketolase	TKT	1.5
Protein-methionine sulfoxide oxidase MICAL1	MICAL1	0.7
Signal peptidase complex subunit 2	SPCS2	0.6
Serine--tRNA ligase, cytoplasmic	SARS	0.6
Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	PRDX3	0.6
Ig gamma-2 chain C region	IGHG2	0.5
C-type lectin domain family 4 member D	CLEC4D	0.5
Protein PML	PML	0.5
Ig gamma-4 chain C region	IGHG4	0.5
Matrix metalloproteinase-9	MMP9	0.5
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D3	UBE2D3	0.5
Ig gamma-3 chain C region	IGHG3	0.5
Ig gamma-1 chain C region	IGHG1	0.4
Glutaminyl-peptide cyclotransferase	QPCT	0.4
Ig alpha-1 chain C region	IGHA1	0.3
Ig alpha-2 chain C region	IGHA2	0.3
L-selectin	SELL	0.2
Serotransferrin	TF	0.1

Tabelle 9 Signifikant regulierte Proteine bei den LPS-stimulierten neutrophilen Granulozyten

Die regulierten Proteine wurden prozentual bezüglich der biologischen Prozessen, in welche sie involviert waren, analysiert (Abbildung 26).

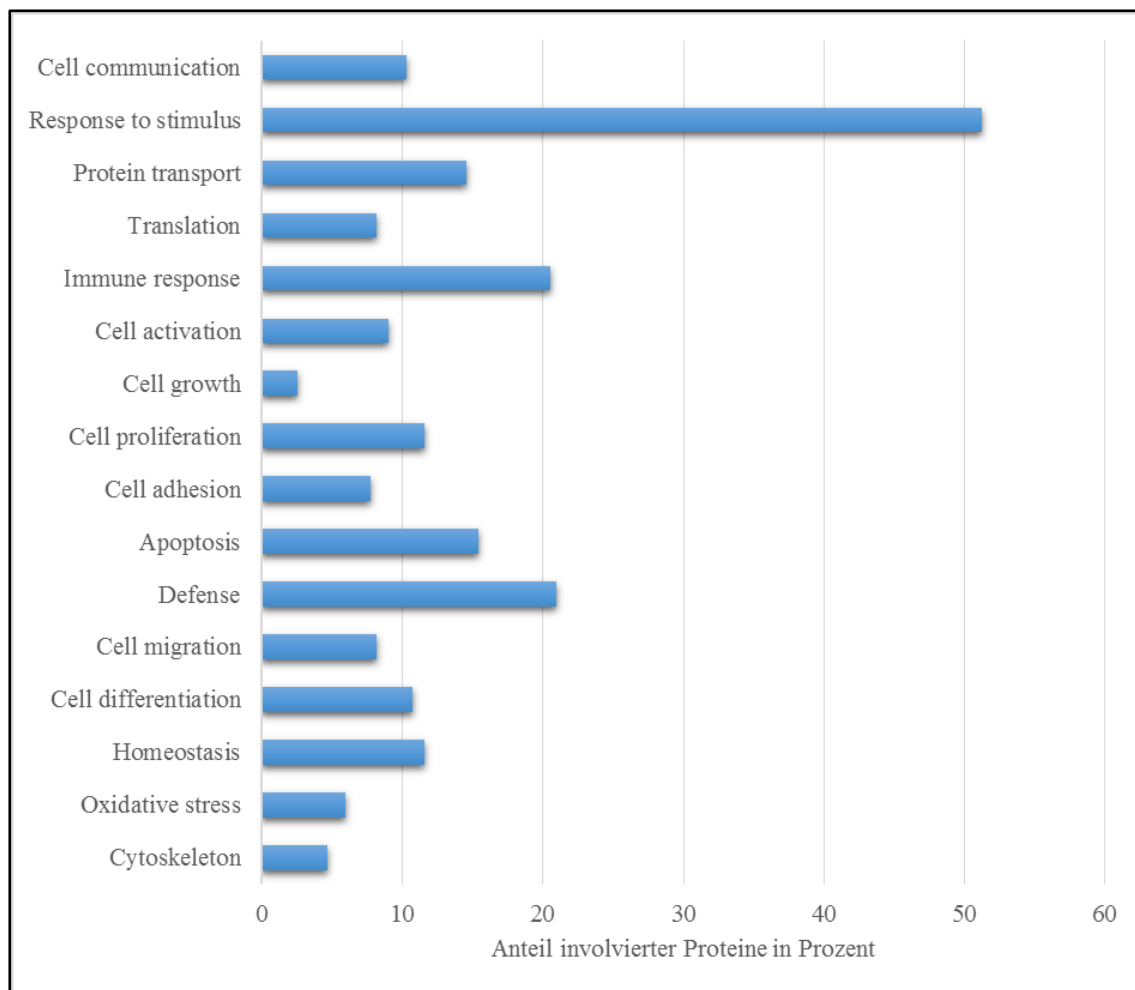


Abbildung 26 Biologische Prozesse der regulierten Proteine bei den LPS-stimulierten neutrophilen Granulozyten

Unter den erhöht detektierten Proteinen befand sich das „Intercellular adhesion molecule 1“ (ICAM1). Es handelt sich dabei um ein für die Adhäsion und transzelluläre Migration essentielles Protein der neutrophilen Granulozyten (Ley et al. 2007). „Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate“ (MARCKS) ist ein Protein, welches als Substrat für die Proteinkinase C eine Rolle in der Signaltransduktion übernimmt und CALM und Kalzium bindet (Nakamura and Yamamura 2010). Des Weiteren gibt es Hinweise dafür, dass es als Schlüsselregulator bei der Migration und Adhäsion neutrophiler Granulozyten fungiert (Eckert et al. 2010). Weiterhin fand sich das „Signal recognition particle 9 kDa protein“ (SRP9), welches eine wichtige Rolle für die Funktion des endoplasmatischen Retikulums spielt (Magrane and Uniprot Consortium 2011).

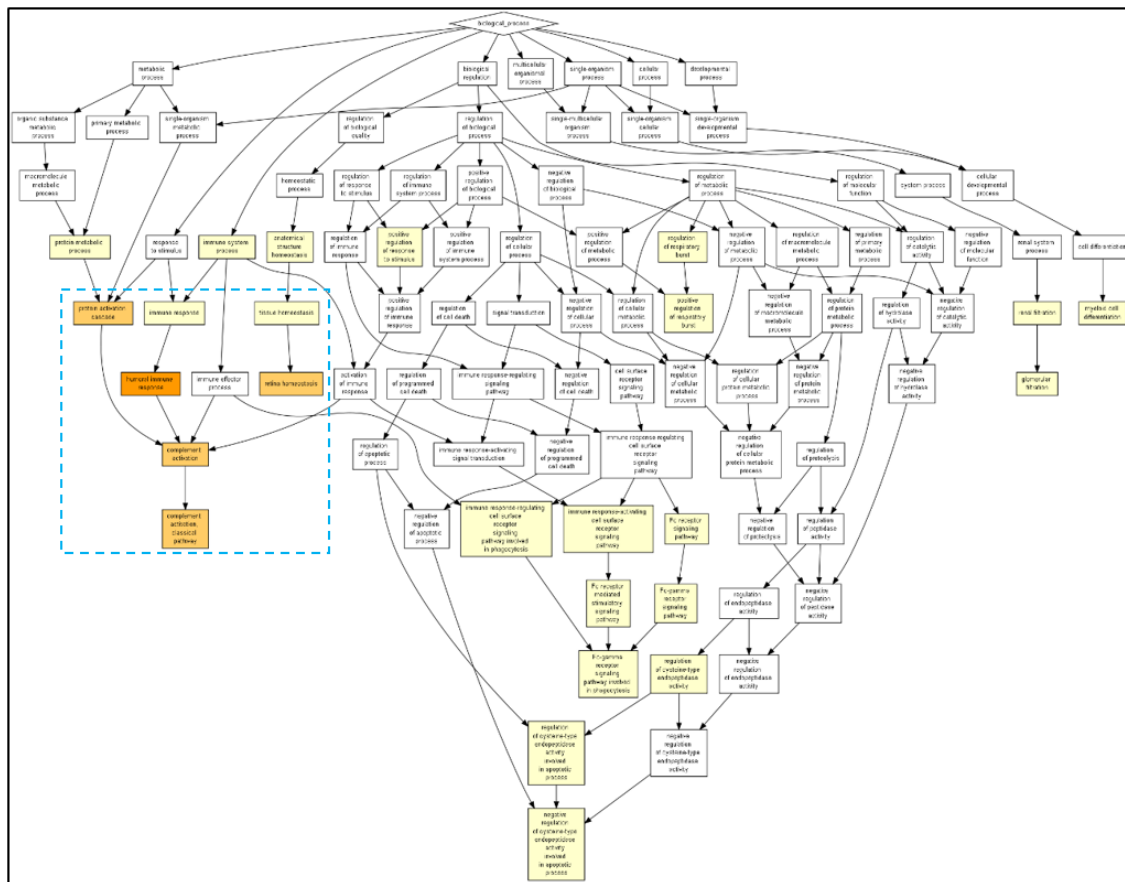


Abbildung 27 GOrilla-Analyse der erniedrigten Proteine in der Kategorie „Biologischer Prozess“ (Überblick)

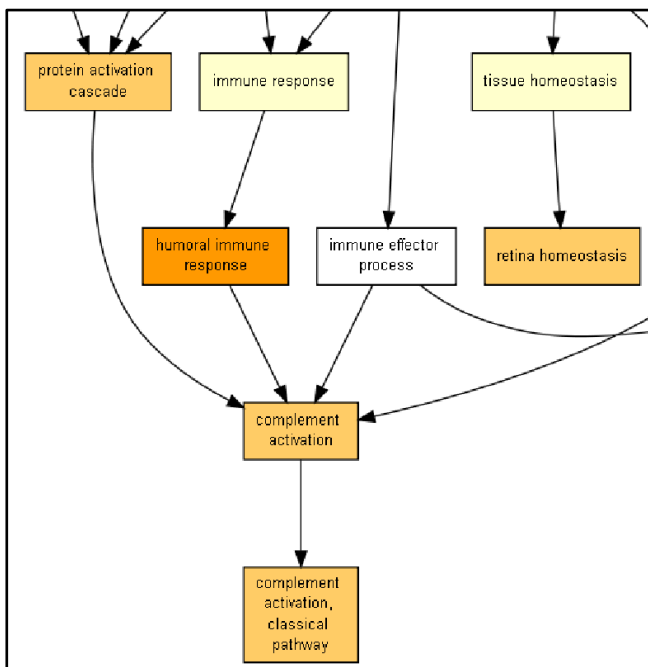


Abbildung 28 Vergrößerter Ausschnitt aus Abbildung 27

Es wurden mehrere erniedrigt regulierte Proteine detektiert. Mittels Analysesoftware wurden überrepräsentierte Go-Term-Kategorien gegenüber der Gesamtheit aller detektierten Proteine herausgefiltert (Abbildung 27). Die meisten überrepräsentierten Go-Terme standen im Bezug zur Immunantwort (Abbildung 28). So wurde in der Kategorie „Biologischer Prozess“ an erster Stelle „Humorale Immunantwort“, an zweiter und dritter Stelle „Komplementaktivierung“ und an fünfter Stelle „Proteinaktivierungskaskade“ aufgeführt. Unter „Molekulare Funktionen“ fanden sich „Antigenbindung“ und „Immunglobulinrezeptorbindung“. In der Kategorie „Zelluläre Komponente“ zeigten sich neben zahlreichen den Immunkomplexen zugeordneten Kategorien die Go-Terme „Blutmikropartikel“ und „Extrazellulärregion“.

Verantwortlich für die klare Tendenz zu dem Immunsystem-assoziierten Go-Termen war vor allem, dass sich unter den Proteinen sechs Vertreter der Immunglobuline fanden. Es handelte sich dabei um die konstanten Anteile jeweils aller vier IgG (\triangleq Ig gamma)-Subklassen und der beiden IgA (\triangleq Ig alpha)-Subklassen. Immunglobuline bestehen aus einer konstanten und einer variablen Domäne. Sie werden von B-Lymphozyten und den daraus entstehenden Plasmazellen synthetisiert und im Rahmen der humoralen Immunreaktion sezerniert (Herold 2011).

Am stärksten herunterreguliert war das Protein „Serotransferrin“ (TF). Es handelt sich um ein hauptsächlich in der Leber synthetisiertes und dann sezerniertes Protein, welches in den Eisentransport involviert ist und als klinisches Diagnostikum bei der Differentialdiagnose der Anämie eine wichtige Rolle spielt (Magrane and Uniprot Consortium 2011; Herold 2011). Zu einer Assoziierung mit neutrophilen Granulozyten dieses Proteins wurde bisher nur sehr wenig beschrieben.

Am zweitstärksten herunterreguliert war SELL. Dieses Protein wird auf der Oberfläche der meisten Leukozyten exprimiert und ist essenzieller Bestandteil der neutrophilen Aktivierungskaskade. Es ist in die Interaktion zwischen neutrophilen Granulozyten und der endothelialen Zelloberfläche, zum Beispiel beim „Rolling“, involviert (Ley et al. 2007, Kapitel 1.1.1).

„Matrix metalloproteinase-9“ (MMP9) ist ein proteolytisch wirkendes Protein, welches an mehreren Prozessen beteiligt ist. Es gibt Hinweise darauf, dass es wichtig für die Leukozytäre Migration, die Zelldifferenzierung und die Organisation der extrazellulären Matrix ist (Magrane and Uniprot Consortium 2011).

4.3.3 Regulierte Proteine in ATP/ LPS-stimulierten neutrophilen Granulozyten

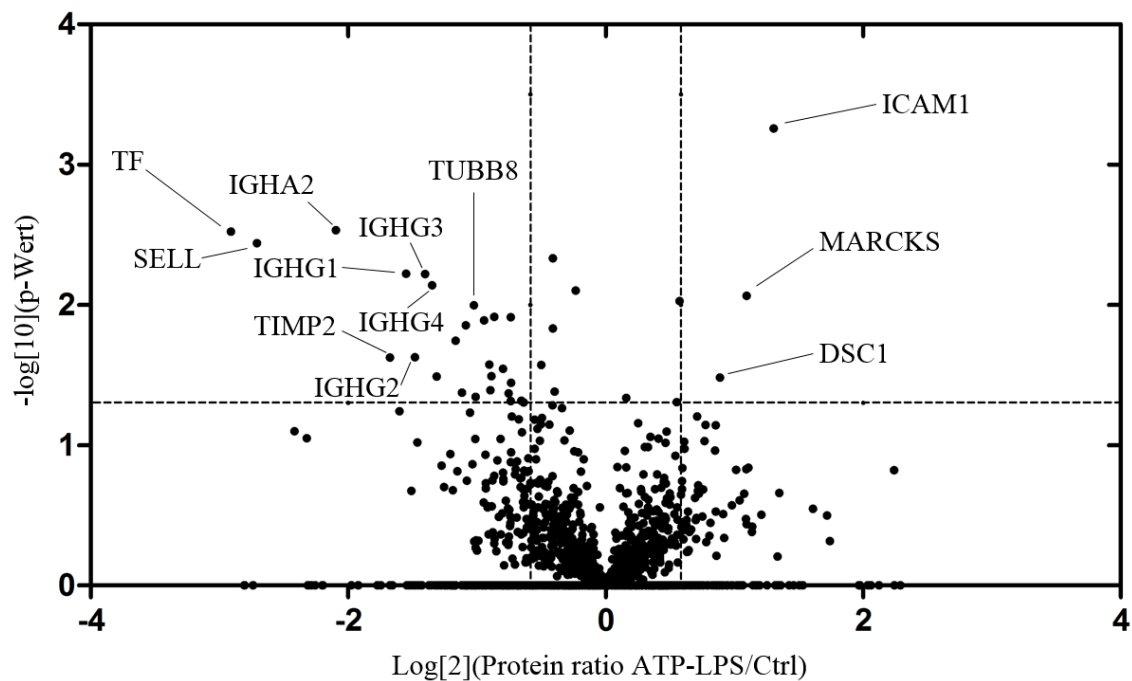


Abbildung 29 Volcano Plot der Proteine bei den ATP/ LPS-stimulierten neutrophilen Granulozyten

Bei der kombinierten Stimulation mit ATP und LPS fanden sich mit drei signifikant erhöhten und 26 signifikant erniedrigten die meisten regulierten Proteine innerhalb der drei Zellkultur-Versuche (Abbildung 29, Tabelle 10).

Proteinname	Genname	Relative Veränderung
Intercellular adhesion molecule 1	ICAM1	2.5
Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	MARCKS	2.1
Desmocollin-1	DSC1	1.8
Heterochromatin protein 1-binding protein 3	HP1BP3	0.6
Integrin alpha-L	ITGAL	0.6
Malate dehydrogenase	MDH2	0.6
Transmembrane emp24 domain-containing protein 5	TMED5	0.6
Thioredoxin-like protein 1	TXNL1	0.6
Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily A member 3	LILRA3	0.6
Ribosomal protein S6 kinase alpha-3	RPS6KA3	0.6
Matrix metalloproteinase-9	MMP9	0.5
Protein Niban	FAM129A	0.5
Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoforms Xlas	GNAS	0.5
Tubulin beta-6 chain	TUBB6	0.5
Myeloid-associated differentiation marker	MYADM	0.5
Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15	DHX15	0.5
Tubulin beta-8 chain	TUBB8	0.5
Mannose-1-phosphate guanyltransferase beta	GMPPB	0.5
Exportin-1	XPO1	0.5
Phosphate carrier protein, mitochondrial	SLC25A3	0.4
Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 8	ADAM8	0.4
Ig gamma-4 chain C region	IGHG4	0.4
Ig gamma-3 chain C region	IGHG3	0.4
Ig gamma-2 chain C region	IGHG2	0.4
Ig gamma-1 chain C region	IGHG1	0.3
Metalloproteinase inhibitor 2	TIMP2	0.3
Ig alpha-2 chain C region	IGHA2	0.2
L-selectin	SELL	0.2
Serotransferrin	TF	0.1

Tabelle 10 Signifikant regulierte Proteine bei den ATP/ LPS-stimulierten neutrophilen Granulozyten

Die regulierten Proteine wurden prozentual bezüglich der biologischen Prozessen, in welche sie involviert waren, analysiert (Abbildung 30).

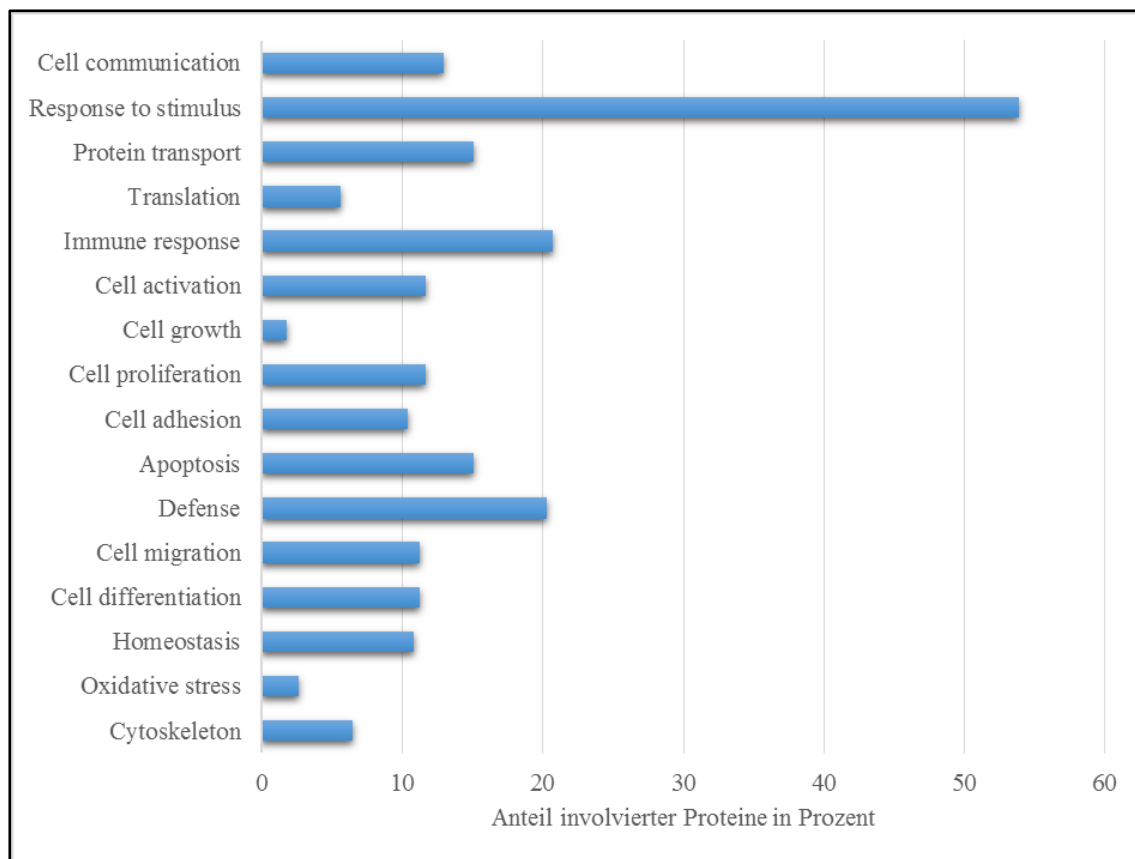


Abbildung 30 Biologische Prozesse der regulierten Proteine bei den ATP/LPS-stimulierten neutrophilen Granulozyten

Alle drei hochregulierten Proteine sind in Zell-Zell-Kontakt- und Zellmigrationsprozesse involviert. Auf die Eigenschaften der Proteine ICAM1 und MARCKS wurde bereits näher eingegangen (Kapitel 4.3.2), da sie auch in den dort beschriebenen Ergebnissen hochreguliert waren. Als dritter Vertreter ist das membranständige Protein „Desmocollin-1“ (DSC1) an Zell-Zell-Kontakten beteiligt. Es wurde allerdings bisher vor allem in epithelialen Zellen nachgewiesen. Es handelt sich ebenfalls um ein kalziumbindendes Protein (Magrane and Uniprot Consortium 2011).

Stellte man bei den erniedrigt detektierten Proteinen mittels Analysesoftware den Vergleich her zu allen detektierten Proteinen, fanden sich viele Go-Termini, die im Zusammenhang mit der humoralen Immunantwort stehen, überpräsentiert. So ließen sich in der Kategorie „Biologischer Prozess“ an den ersten Positionen „Komplementaktivierung“, „Humorale Immunantwort“, „Proteinaktivierungskaskade“ und „Positive Regulierung der Stimulusantwort“ identifizieren. Unter „Molekularen Funktionen“ fanden sich die Go-Terme „Antigenbindung“ und „Bindung von Zelladhäsionsmolekülen“. Zehn der Proteine wurden in der Kategorie „Zelluläre Komponente“ dem Go-Term „Extrazellulärregion“ zugeordnet und sechs dem Go-Term „Blutmikropartikel“.

Die Eigenschaften der auch hier erniedrigten Proteine TF, MMP9 und SELL wurden bereits im vorherigen Kapitel erörtert. Auch bezüglich der Immunglobuline wurden bei den ATP/ LPS-stimulierten Zellen ähnliche Ergebnisse wie bei der LPS-Einzelstimulation erzielt. Einzig „Ig alpha-1 chain C region“ (IGHA2) war bei diesen Versuchen nicht signifikant reguliert, im Gegensatz zur LPS-Einzelstimulation.

Das Protein „Metalloproteinase inhibitor 2“ (TIMP2) wirkt vielen Metalloproteinasen, darunter auch der bei diesen und den LPS-Versuchen erhöht gemessenen MMP9, entgegengesetzt (Magrane and Uniprot Consortium 2011).

„Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 8“ (ADAM8) ist in viele biologische Prozesse wie beispielsweise Zelladhäsion, Zellmigration und die Immunantwort involviert (Brown et al. 2015). Es wurde, allerdings in Makrophagen, bei der Pathophysiologie von pankreatischen Adenokarzinomen mit der MMP9 in Verbindung gebracht (Puolakkainen et al. 2014).

„Exportin-1“ (XPO1) ist für den Export zellulärer Proteine aus dem Nucleus heraus zuständig und wurde bereits in Leukozyten nachgewiesen (Magrane and Uniprot Consortium 2011).

4.3.4 Bezug der Ergebnisse aller drei Experimente aufeinander

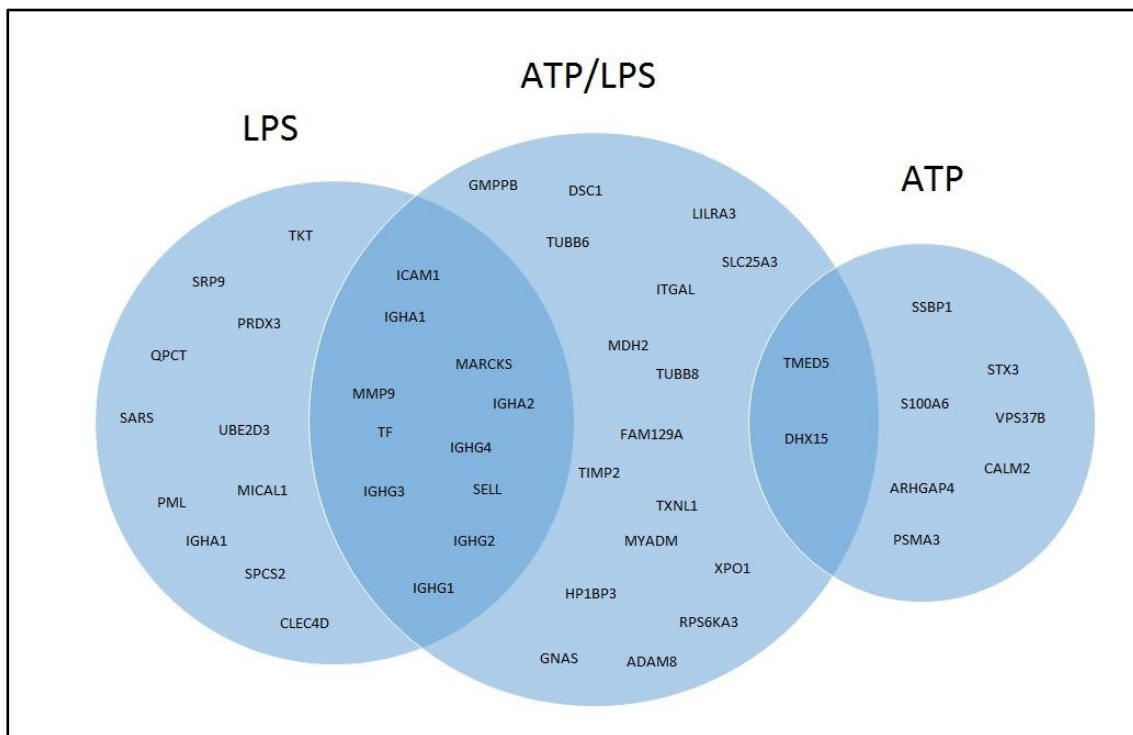


Abbildung 31 Überschneidungen der signifikant reguliert gemessenen Proteine zwischen den drei Versuchen. Genannt sind die Namen der für die Proteine kodierenden Gene. In den Überschneidungsflächen sind jene Proteine aufgeführt, welche in den beiden angrenzenden Versuchen reguliert gemessen wurden

Die drei Versuche unterschieden sich bezüglich der in ihnen detektierten erhöhten und erniedrigten Proteine, wobei auch Überschneidungen zu verzeichnen waren (Abbildung 31).

Bei den ATP-Stimulationsversuchen waren neun Proteine signifikant reguliert, davon vier erhöht und fünf erniedrigt. Bei den LPS-stimulierten neutrophilen Granulozyten waren 22 Proteine signifikant reguliert, davon wurden 18 Proteine erhöht und vier Proteine erniedrigt gemessen. Bei den durch die Kombination aus ATP und LPS stimulierten neutrophilen Granulozyten konnten 29 regulierte Proteine detektiert werden. Davon wurden 26 Proteine erhöht und drei Proteine erniedrigt gemessen.

Zwischen den ATP- und den LPS-Stimulationsversuchen gab es bezüglich der regulierten Proteine keine Überschneidungen. Zwei regulierte Proteine wurden sowohl bei alleiniger ATP-Stimulation, als auch in der ATP/ LPS-Kombination detektiert. Davon war in beiden Versuchen eins erhöht und eins erniedrigt. Im Vergleich der LPS- und der ATP/ LPS-Versuche fanden sich zehn Proteine, die in beiden Versuchen reguliert waren. Davon waren in beiden Versuchen zwei Proteine erhöht und acht Proteine erniedrigt.

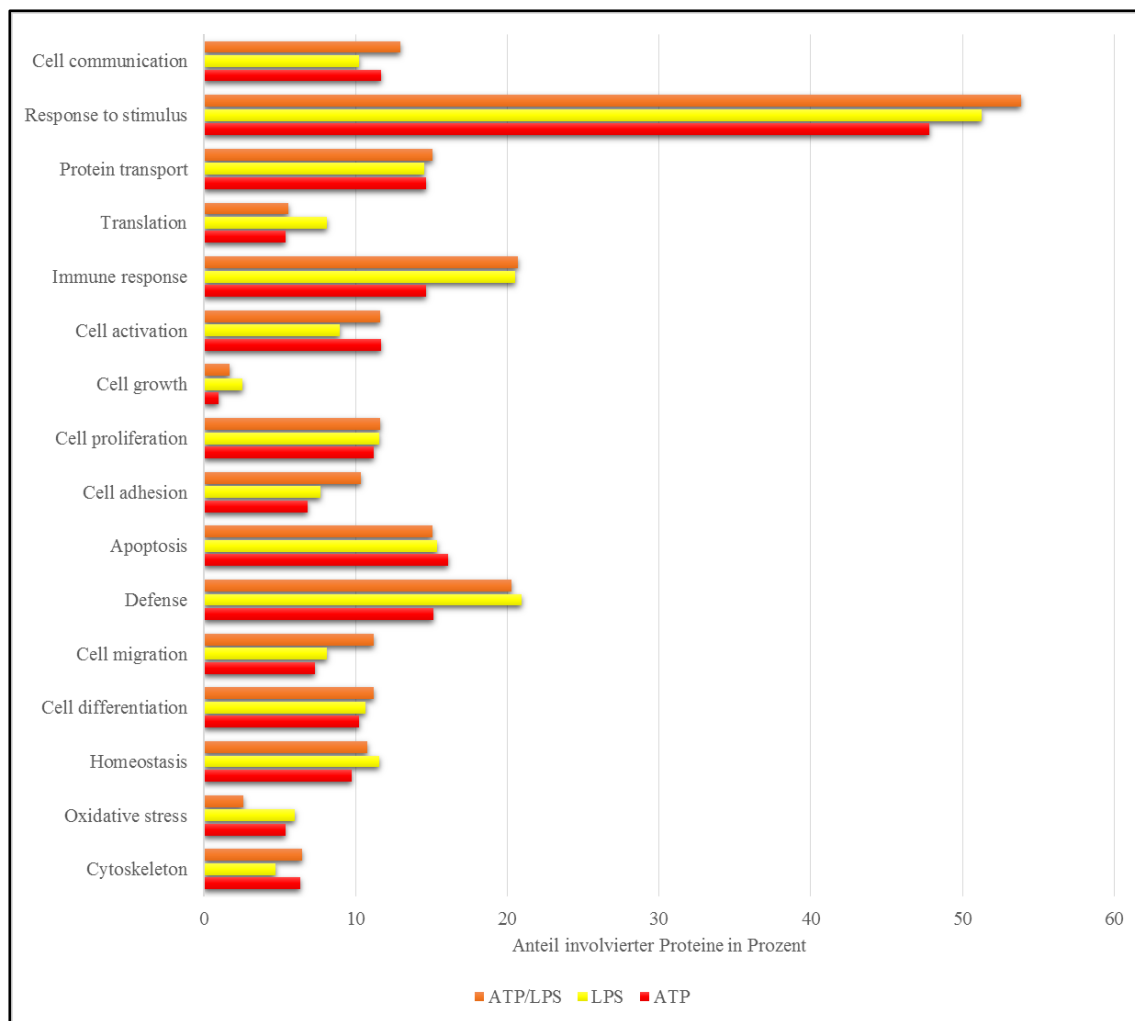


Abbildung 32 Biologische Prozesse im Vergleich

Es wurden die Ergebnisse von Abbildung 24, Abbildung 26 und Abbildung 30 miteinander verglichen. Die Ergebnisse aller Versuche entsprachen sich weitestgehend (Abbildung 32).

Den Kategorien Immunantwort und Abwehr wurden bei den ATP-Versuchen prozentual deutlich weniger Proteine zugeordnet als bei den anderen beiden Versuchsreihen. In den Kategorien Translation, Zellaktivierung und Zytoskelett sind die Ergebnisse der ATP- und der ATP/ LPS-Kombinationsstimulation einander ähnlich und unterscheiden sich von denen der LPS-Einzelstimulation.

5 Diskussion

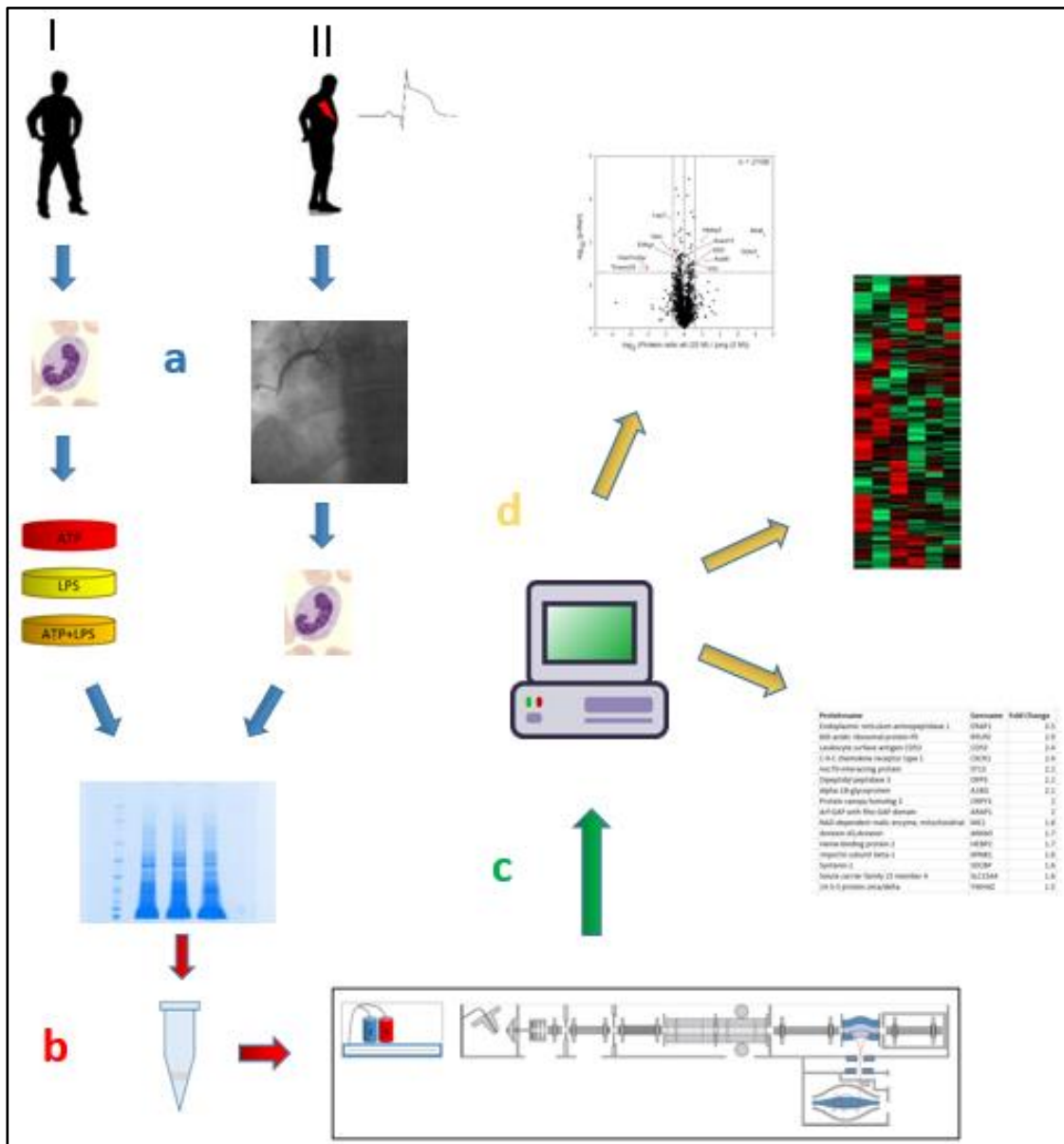


Abbildung 33 Übersicht der Versuche dieser Arbeit: Im Rahmen der Stimulationsversuche (I) wurden neutrophile Granulozyten von Probanden isoliert und anschließend mit ATP, LPS und ATP/ LPS stimuliert. Im Rahmen der in vivo-Versuche (II) wurden neutrophile Granulozyten von STEMI-Patienten isoliert (a). Es folgte der In-Gel-Verdau und die Aufladung der daraus resultierenden Peptide auf STAGE-Tips (b). Die massenspektrometrischen Messungen (c) lieferten Rohdaten, welche mittels Analysesoftware ausgewertet wurden (d) und zu Ergebnissen führten, die Aussagen über Konzentrationsunterschiede zwischen den verschiedenen Proben bezüglich der gefundenen Proteine zuließen. Für beide Versuchsreihen (I und II) wurden Vergleichsproben als Kontrollen angelegt (in diesem Schema nicht aufgeführt)

Der akute Myokardinfarkt ist ein Krankheitsbild mit enormer klinischer Relevanz. Aus diesem Grund sind seine Pathogenese und die damit einhergehenden therapeutischen und präventiven Ansätze zentrale Bestandteile der aktuellen kardiologischen Forschung. Im Folgenden sollen die im Rahmen dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse diskutiert, interpretiert und bezüglich ihrer klinischen Relevanz erörtert werden.

5.1 Methode

5.1.1 Zeitpunkt der Probengewinnung bei STEMI-Patienten

Bei den Überlegungen zum geeignetsten Zeitpunkt der Probengewinnung wurden mehrere Aspekte bedacht. So galt es, möglichst ähnliche Bedingungen für alle Probanden zu schaffen. Der STEMI wird allerdings oft nicht bei Eintritt des Krankheitsbildes vom Patienten bemerkt. So wachen Betroffene beispielsweise oft mit Brustschmerzen auf, nachdem der Infarkt allerdings schon Stunden vorher in der Nacht stattgefunden hat (Herold 2011). Um dennoch möglichst ähnliche Voraussetzungen zu schaffen, wurde von uns der frühestmögliche Zeitpunkt für die Blutentnahme gewählt. Dieser Zeitpunkt war mit Eintreffen des Patienten im Herzkatheterlabor des Krankenhauses erreicht.

Medikamentöse Interventionen durch den Notarzt vor Eintreffen in das Krankenhaus waren unvermeidbar und müssen als das Ergebnis beeinflussende Faktoren bedacht werden. Zu diesen gängigen medikamentösen Interventionen gehören die Gabe von Thrombozytenaggregationshemmern, Betablockern, Morphinen, Statinen und Heparinen. Die Blutprobe wurde allerdings noch vor der koronararteriellen Reperfusion mittels PTCA (Percutane transluminale Koronarangioplastie) gewonnen. Die PTCA wird heutzutage standardmäßig beim STEMI durchgeführt und geht mit der Gabe von Kontrastmittel und weiteren Medikamenten einher. Außerdem wird die Pathologie des Myokardinfarktes durch die PTCA maßgeblich beeinflusst, da verschlossene Herzkranzgefäße wieder eröffnet werden (Van de Werf, F. et al. 2008). Dies wäre ein weiterer das Ergebnis beeinflussender Faktor gewesen.

Insgesamt wurde der Einfluss der medizinischen Herzinfarkttherapie und medizinischer Interventionen auf die Pathologie des STEMIs somit bestmöglich minimiert.

5.1.2 Methodisches Vorgehen, Patienten- und Probandenkollektiv

Bei der Auswahl der STEMI-Patienten wurde darauf geachtet, den Einfluss anderer Erkrankungen auf neutrophile Granulozyten als Zellen des Immunsystems möglichst gering

zu halten. Aus diesem Grund wurden als Ausschlusskriterien Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, chronisch-entzündliche Erkrankungen, chronische und akute Infektionen definiert. Des Weiteren wurden nur männliche Patienten in die Studie mit eingeschlossen, um zyklusabhängige Einflüsse auszuschließen. Insgesamt konnte somit ein sehr homogenes Probandenkollektiv akquiriert und pathophysiologische äußerliche Einflussfaktoren auf die neutrophilen Granulozyten minimiert werden.

Die Blutproben für die Zellkulturversuche stammten von gesunden Probanden. Hier waren möglichst ähnliche Zustände zwischen den einzelnen Proben im Voraus anzustreben, sodass der ausschließliche Einfluss durch die Stimulanzen auf proteomische Veränderungen herausgefiltert wurde. Wir gingen davon aus, dass junge, gesunde, männliche Probanden die geeignetste Population für diese Versuche waren, da sie das homogenste aller möglichen Probandenkollektive darstellten.

Beim Vergleich der beiden experimentellen Ansätze untereinander ist anzumerken, dass bei den Stimulationsversuchen im Vergleich zu den STEMI-Versuchen homogenere Probandenkollektive akquiriert werden konnten. So stammten bei den Stimulationsversuchen die stimulierten Granulozyten und die Granulozyten der Kontrollgruppe jeweils vom selben Spender und aus derselben Zellisolation. Es herrschten damit sehr gute experimentelle Voraussetzungen und es kann davon ausgegangen werden, dass die proteomischen Veränderungen als Korrelat der Stimulation entstanden und interindividuelle Unterschiede durch das experimentelle Vorgehen herausgefiltert werden konnten.

Bei den STEMI-Versuchen war dies nicht der Fall, da die Beeinflussung der Ergebnisse durch weitere Erkrankungen der Patienten und Probanden oder durch interindividuelle Unterschiede im granulozytären Proteom möglich war. Um diese Einflussfaktoren zu vermeiden, könnten ähnliche Analysen beispielsweise im Rahmen von Tierversuchen durchgeführt werden, bei denen die neutrophilen Granulozyten der Versuchstiere vor und nach einem künstlich herbeigeführten Myokardinfarkt analysiert und miteinander verglichen würden. Bei diesem Ansatz müsste man allerdings von im Tierversuch erlangten Ergebnissen auf pathophysiologische Vorgänge beim Menschen schließen, was wiederum einen beeinflussenden Faktor darstellen würde. Außerdem handelte es sich um eine künstlich herbeigerufene Ischämie und nicht um ein klinisch reelles Ereignis, wie in dieser Arbeit.

Im Rahmen einer klinisch-experimentellen Untersuchung an humanen neutrophilen Granulozyten war das hier angewandte Protokoll insgesamt das am besten geeignete zur Erforschung der Fragestellung.

5.1.3 Neutrophile Granulozyten als Fokus dieser Arbeit

Die Pathologie des Myokardinfarktes ist multifaktoriell (Davies 2000). So ist es nicht möglich, alle Faktoren, die prädisponierend wirken und das Infarktgeschehen akut beeinflussen, gleichzeitig zu untersuchen. Vielmehr ist es sinnvoll, einzelne pathogenetische Komponenten getrennt zu untersuchen.

Neutrophile Granulozyten sind die bezüglich der Anzahl meistvertretene Untergruppe der Leukozyten und spielen eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunabwehr (Borre-gaard 2010). Nachdem zunächst ihre pathophysiologische Bedeutung bei der Bekämpfung von Infektionserregern erforscht wurde, wird heute zunehmend auch ihre Rolle bei der sterilen Inflammation, wie sie beim Myokardinfarkt vorliegt, diskutiert. Wie Carbone et al. (2013) konstatieren, spielen neutrophile Granulozyten eine entscheidende Rolle in allen Phasen des Myokardinfarktes. Welche Wichtung dieser Einfluss jedoch gegenüber anderen Faktoren hat und ob er sich insgesamt positiv oder negativ auf das Infarktgeschehen auswirkt, ist bisher unvollständig geklärt (Carbone et al. 2013).

Auf dieser Basis entstand die Idee, neutrophile Granulozyten im myokardialen Infarktgeschehen intensiver zu erforschen. Ihre unumstritten wichtige Rolle bei der Infektionsbekämpfung in Kombination mit dem aktuell unbefriedigenden Stand der Forschung bezüglich ihrer Rolle bei der sterilen Inflammation war der Anlass dafür, hier nach neuen Erkenntnissen zu suchen. Somit entstanden die beiden Ansätze der vorliegenden Arbeit. Erstens sollten neutrophile Granulozyten von STEMI-Patienten mit denen von gesunden Kontrollen verglichen werden. Zweitens sollte in der Zellkultur gezielt der Unterschied zwischen der unsterilen und der sterilen Immunreaktion weiter erforscht werden.

5.1.4 Proteine als Fokus dieser Arbeit

Proteine haben in der Zellbiologie viele verschiedene Funktionen. Sie sind Grundlage des Zytoskelettes und der gesamten Zellarchitektur. Sie sind in Stoffwechselprozesse involviert und katalysieren chemische Reaktionen. Sie werden sezerniert und fungieren als Botenstoffe. Mithilfe der massenspektrometrischen Proteomanalyse konnte dieser Vielfalt an Funktionen und Aufgaben Rechnung getragen werden. Es wurden im Rahmen dieser Arbeit Ergebnisse als Korrelat vielfältiger pathophysiologischer Reaktionen der neutrophilen Granulozyten auf die gesetzten Stimuli akquiriert.

Wie im Folgenden diskutiert wird, beschränkten sich jedoch die beobachteten signifikanten Veränderungen in allen Versuchen auf jeweils wenige Proteine. Insgesamt sprechen diese Ergebnisse dafür, dass ein großer Proteomshift auf der Proteinkonzentrationsebene nicht stattgefunden zu haben scheint. In weiterführenden Untersuchungen wäre es sinnvoll, Proteomveränderungen ergänzend auch auf anderen Ebenen näher zu untersuchen. So wären qualitative Messungen im Rahmen der funktionellen Proteomik, zum Beispiel durch phosphoproteomische Analysemethoden, eine sinnvolle Erweiterung der in dieser Arbeit akquirierten Ergebnisse.

5.1.5 Massenspektrometrie

Bei der Massenspektrometrie handelt es sich um eine Screeningmethode. Dies hat den Vorteil, dass viele Ergebnisse bei verhältnismäßig wenigen Messungen akquiriert werden können. Allerdings waren methodische Grenzen gesetzt. Zum einen handelt es sich bei Massenspektrometern um sehr kostspielige Messgeräte mit einer begrenzten Lebensdauer. Für die Messungen benötigtes Personal, sowie ein erheblicher Energie- und Rohstoffverbrauch (etwa durch die konstant benötigte Stickstoffzufuhr), kamen hinzu. Die Messung jedes einzelnen STAGE-Tips dauerte drei Stunden, was eine Gesamtmessdauer von 33 Stunden pro Probe bedeutete. Ein von vielen Arbeitsgruppen benutztes Massenspektrometer ist bei dieser Messdauer im Laboralltag somit üblicherweise durchgehend in Benutzung. Wir mussten uns im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf eine n-Zahl von drei Probanden/ Patienten pro Gruppe beschränken. Eine größere n-Zahl von Versuchsobjekten könnte zu mehr signifikanten Ergebnissen führen.

Erwähnenswert ist weiterhin, dass die Resultate von der Auswertungssoftware beeinflusst wurden. Die Software in der vorliegenden Arbeit war MaxQuant. Es zeigte sich, dass bei älteren Versionen dieser Software die Ergebnisse sich teils unterschieden von jenen, die mittels einer aktuelleren Version ermittelt wurden. Es ist aber festzuhalten, dass der Algorithmus einer neueren Version die Auswertung stets verbessert und zuverlässiger macht.

5.2 Proteomverteilung auf die Zellkompartimente

Vergleicht man die Verteilungen der identifizierten Proteine auf die großen Zellkompartimente der einzelnen Versuche, fällt auf, dass sich die Ergebnisse nahezu entsprachen (Abbildung 14, Abbildung 20). So entstammten jeweils 57 % der Proteine dem Zytosol,

circa 15 % entstammten der Plasmamembran und 9 % wurden dem Zellkern zugeordnet. Bei allen Versuchen wurden also die größten Zellkompartimente in relevanter Anzahl durch die identifizierten Proteine repräsentiert.

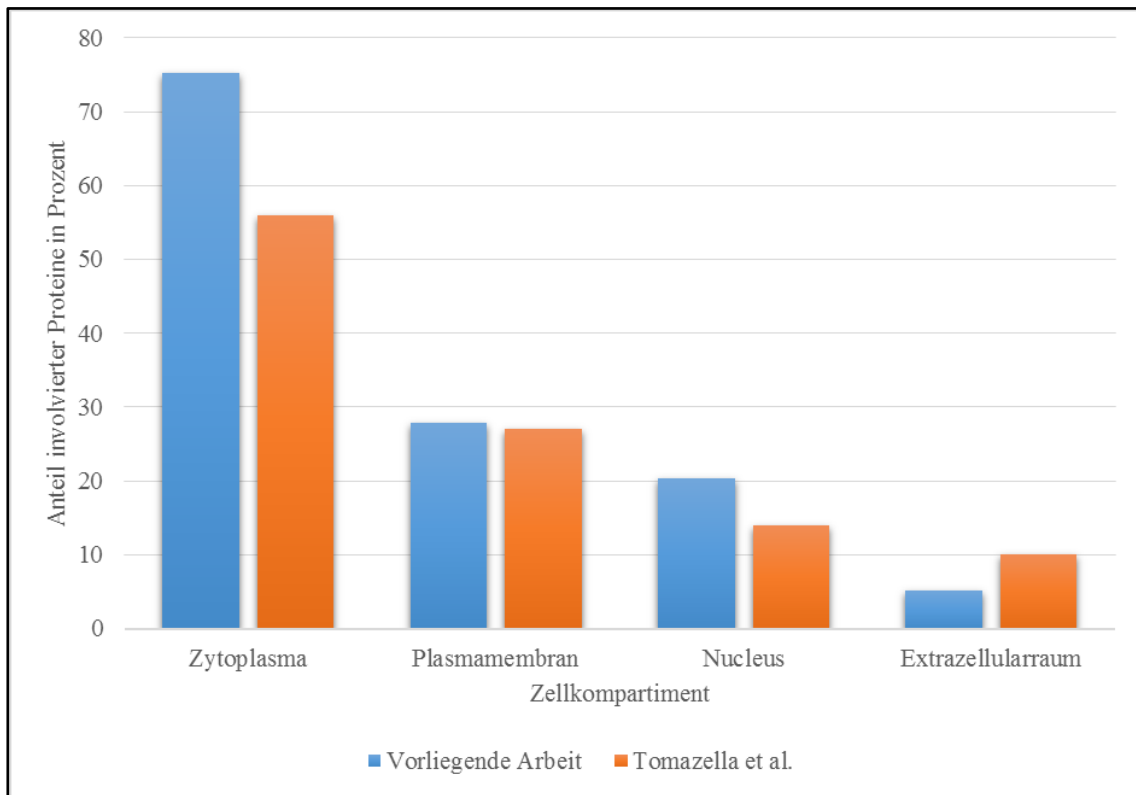


Abbildung 34 Prozentualer Anteil an Proteinen, die bei den Versuchen dieser Arbeit und denen von Tomazella et al. (2009) dem entsprechenden Zellkompartiment zugeordnet sind

Für die nun folgenden Analysen wurden die Ergebnisse der STEMI-Versuche als Grundlage benutzt. Sie sind als repräsentativ auch für die Stimulationsversuche anzusehen, da sich die Ergebnisse beider Versuchsreihen stark ähnelten.

Ziel der Arbeit von Tomazella et al. (2009) war es, das Proteom humaner neutrophiler Granulozyten massenspektrometrisch genauer zu untersuchen. Im Vergleich mit der vorliegenden Arbeit entstammt ein nahezu identischer Anteil der Proteine der Plasmamembran (Abbildung 34). Bei den Messungen der vorliegenden Arbeit sind dem Zytoplasma und dem Zellkern jeweils deutlich mehr Proteine zugeordnet als bei Tomazella et al. (2009), während ein im Vergleich geringerer Anteil dem Extrazellularraum entstammte (Tomazella et al. 2009).

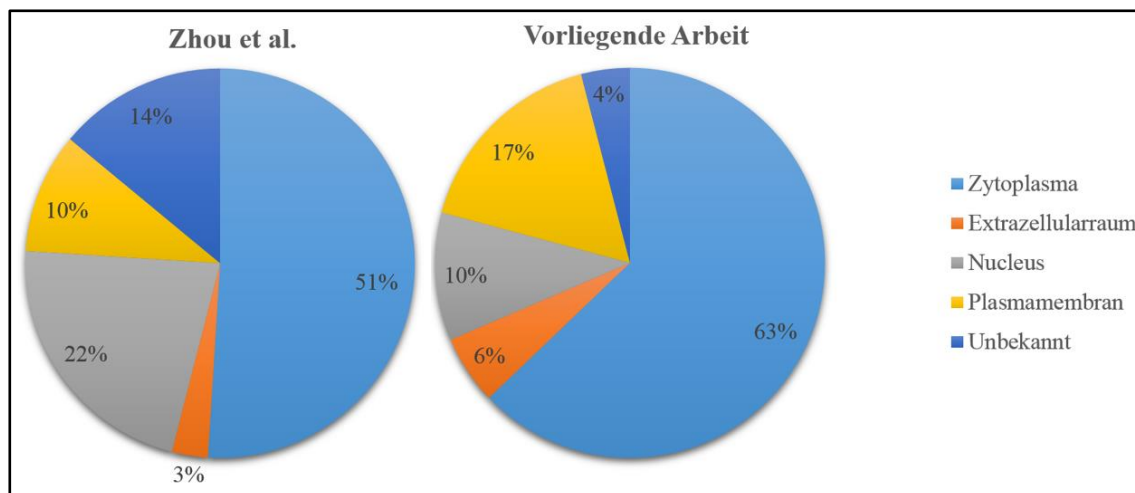


Abbildung 35 Zugehörigkeit der detektierten Proteine zu den Zellkompartimenten. Zum Vergleich sind die Ergebnisse von Zhou et al. (2013) und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit aufgeführt

Zhou et al. (2013) führten eine Proteomanalyse bei neutrophilen Granulozyten von Traumapatienten durch. Auch sie sortierten die detektierten Proteine nach ihrer zellulären Herkunft. Bei ihnen entstammte ein mehr als doppelt so großer Anteil der identifizierten Proteine dem Zellkern (Abbildung 35). Der Anteil an Proteinen aus dem Zytoplasma und aus der Plasmamembran war demgegenüber jeweils um circa 5 % niedriger im Vergleich zur vorliegenden Arbeit (Zhou et al. 2013).

Im Vergleich mit den angesprochenen Arbeiten lassen sich also sowohl Ähnlichkeiten als auch klare Unterschiede bezüglich der Proteomverteilung auf die Zellkompartimente erkennen. Bei allen drei Analysen entstammte der Großteil aller identifizierten Proteine dem Zytoplasma. An zweiter Stelle standen allerdings bei Zhou et al. (2013) Proteine des Zellkerns, gefolgt von Membranproteinen. Tomazella et al. (2009) und die vorliegenden Untersuchungen identifizierten demgegenüber anteilmäßig mehr der Plasmamembran als dem Zellkern zugeordnete Proteine.

Unterschiede zwischen verschiedenen Arbeiten bezüglich der Verteilung der Proteine auf die Zellkompartimente könnten zum einen aus einer erhöhten beziehungsweise erniedrigten Proteinbiosynthese resultieren. Auch eine erhöhte oder erniedrigte Sezernierung bestimmter Proteine ist als Ursache denkbar. Allerdings ist die Anzahl identifizierter Proteine auch maßgeblich von der Aufarbeitung einer Probe und der verwendeten Messmethode abhängig. Um beispielsweise möglichst viele Membranproteine zu detektieren, werden andere Protokolle verwendet, als wenn speziell die Granula neutrophiler Granulozyten untersucht werden sollen (Rehm and Letzel 2010). Eine abweichende Vorgehensweise im Labor könnte also ebenfalls der Grund dafür sein, dass bei Zhou et al. (2013) ein höherer Anteil der Proteine dem Zellkern zugeordnet wurde.

5.3 Proteomische Analyse neutrophiler Granulozyten von STEMI-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen

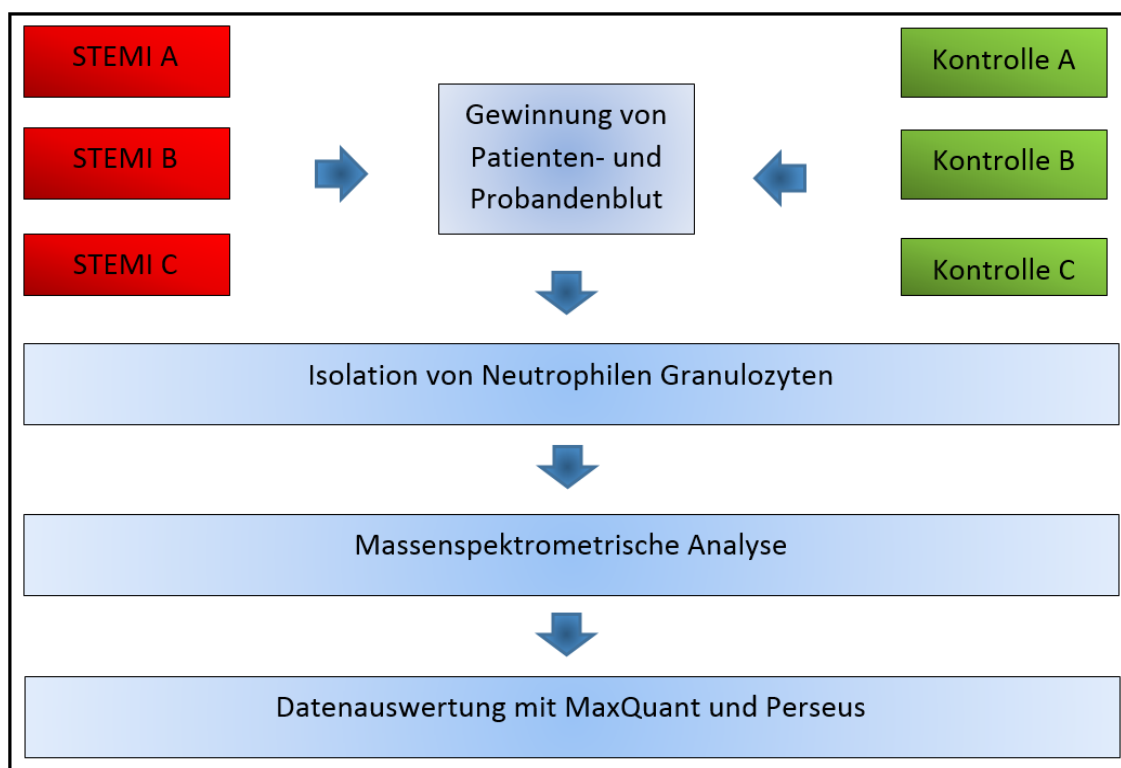


Abbildung 36 Versuchsübersicht der in vivo-Versuche

5.3.1 Proteomprofil

Die hierarchische Clusteranalyse (Abbildung 15) verdeutlicht, dass sich die Proteommuster zwischen den einzelnen Proben erheblich unterscheiden. Es ist erkennbar, dass auf gesamtproteomischer Ebene keine Übereinstimmungen zwischen den Proben vorlagen. Auffällig ist auch, dass keinerlei Gruppierung zwischen den beiden Versuchsgruppen erkennbar ist. Dies wird am deutlichsten im Dendrogramm. Dort ist ersichtlich, dass bezüglich der Ähnlichkeiten des Proteoms oft Kontrollen und STEMI-Patienten die meisten Ähnlichkeiten aufwiesen. Kontrolle A und STEMI C boten hierbei das eindrucklichste Beispiel. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch die Veranschaulichung im Streudiagramm (Abbildung 16). Es sind zwar durchaus Kombinationen von Versuchspaaren erkennbar, bei denen mehrere Proteine unterschiedliche LFQ-Intensitäten, sprich hohe oder niedrige relative Veränderungen, zeigten. In diesem Fall lagen Punktwolken vor, die eher eine breite Form hatten. Es sind aber auch sehr schmale Punktwolken zu finden als

Korrelat eines sehr geringen Unterschiedes im Proteom. Eine Systematik ließ sich nicht feststellen.

Unterschiede zwischen den Proben oder gar den Gruppen STEMI und Kontrollen auf gesamtproteomischer Ebene wurden insgesamt also nicht verzeichnet. Die Abbildungen visualisieren die starken interindividuellen Unterschiede zwischen den einzelnen Proben. Systematische Unterschiede zwischen STEMI-Granulozyten und Kontroll-Granulozyten waren auf einzelne Proteine oder kleinere Proteingruppen beschränkt.

5.3.2 Biologische Prozesse

Wichtige Funktionen neutrophiler Granulozyten als Effektoren des Immunsystems werden durch das detektierte Proteom widergespiegelt (Abbildung 18). Prozesse aus maßgeblichen Kategorien wie Immunantwort, Zellaktivierung, Zelladhäsion oder Apoptose sind durch große Anteile an Proteinen repräsentiert.

Tomazella et al. (2009) führten eine ähnliche Zuordnungsanalyse ihrer Ergebnisse durch. Ihre Vorgehensweise bei der Auswertung unterschied sich allerdings von der hier angewandten. Sie ordneten jedem Protein nur einen biologischen Prozess zu, während bei der Analyse dieser Arbeit auch die Zuordnung zu mehreren biologischen Prozessen möglich war. Trotzdem lassen sich bezüglich der Verhältnisse der aufgeführten biologischen Prozesse Vergleiche zueinander zwischen den Arbeiten ziehen (Abbildung 37).

Bei Tomazella et al. (2009) wurden einige Kategorien etwas anders benannt. Bei diesen Kategorien wurden deshalb die beiden entsprechenden Bezeichnungen der verschiedenen Arbeiten zusätzlich in Klammern angegeben.

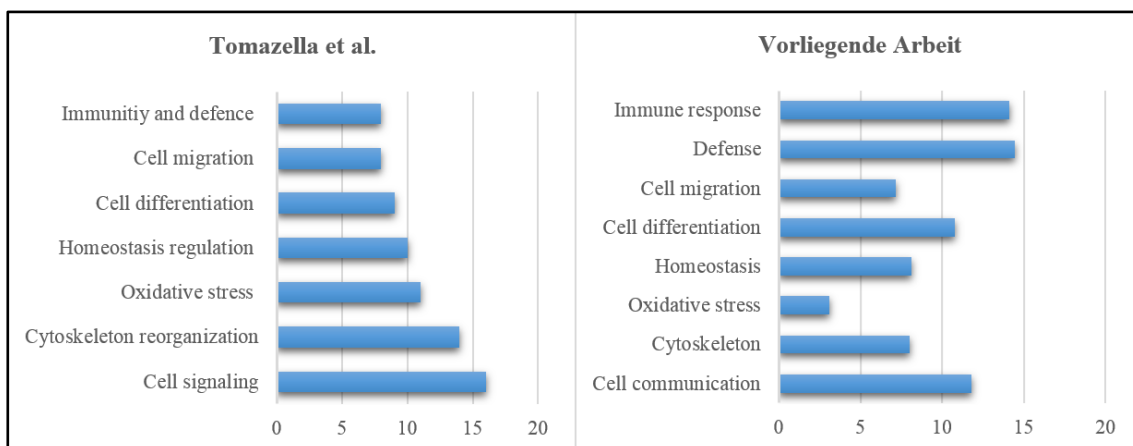


Abbildung 37 Vergleich der Involvierung in verschiedene biologische Prozesse (in Prozent) der Arbeit von Tomazella et al. (2009) mit der vorliegenden Arbeit

Bei Tomazella et al. (2009) dominierten die Kategorien Zell-Zell-Signaltransduktion (cell signaling), Zytoskelett-Reorganisation, Oxidativer Stress, Homöostase, Zelldifferenzierung, Zellmigration und Immunabwehr (immunity and defence).

In den Kategorien Zellkommunikation (cell communication bzw. cell signaling), Homöostase (homeostasis bzw. homeostasis regulation), Zelldifferenzierung und Zellmigration finden sich in beiden Arbeiten hohe Prozentsätze. Den Kategorien Immunantwort (immune response) und Immunabwehr (defense) wurden in der vorliegenden Arbeit höhere Anteile an Proteinen zugeordnet. Die Kategorien Zytoskelett (cytoskeleton bzw. cytoskeleton reorganisation) und Oxidativer Stress demgegenüber waren in der vorliegenden Arbeit im Vergleich deutlich weniger repräsentiert.

Tomazella et al. (2009) analysierten neutrophile Granulozyten von gesunden Probanden, während in der vorliegenden Arbeit die von STEMI-Patienten untersucht wurden. Dies könnte Einfluss auf die dominierenden biologischen Prozesse gehabt haben. Eine im Vergleich zu Tomazella et al. (2009) Mehrpräsenz der Kategorien Immunantwort und Immunabwehr könnte also Resultat eines Proteomshifts in diese Richtung sein, welcher im Rahmen der STEMI-bedingten Inflammationsreaktion bedingt wurde. Es wäre allerdings aus pathophysiologischer Sicht zu erwarten gewesen, dass bei der vorliegenden Arbeit die Kategorie Oxidativer Stress im Gegensatz zu Tomazella et al. (2009) gleich oder stärker repräsentiert worden wäre, da dieser ebenfalls ein wichtiger Prozess in der granulozytären Aktivierung ist (Amulic et al. 2012).

Differenzierte Aussagen bezüglich eines Proteomshifts in bestimmte Richtungen lassen sich also in der gesamtproteomischen Analyse der biologischen Prozesse nicht treffen. Viele biologische Prozesse, welche im Rahmen der granulozytären Aktivierung eine Rolle spielen, wurden vermehrt detektiert im Vergleich zu Tomazella et al. (2009) – allerdings gibt es wie oben beschrieben auch dieser Tendenz entgegengesetzte Ergebnisse. Die quantitative Analyse der biologischen Prozesse reicht also für eine Aussage diesbezüglich nicht aus. Vielmehr muss eine qualitative Analyse der einzelnen regulierten Proteine erfolgen, um entsprechende Aussagen treffen zu können.

Apoptose und Nekrose

Der Apoptose zugeordnete Proteine sind bei den regulierten Proteinen in größerem Maße identifiziert worden. Im direkten Vergleich (Abbildung 19) ist ersichtlich, dass der Prozentsatz Apoptose-involvierter Proteine bei den erniedrigten Proteinen größer ist, als bei den erhöhten.

Betrachtet man die regulierten Proteine im Detail, fällt eine Hochregulierung von CD53 auf. Dieses Protein wurde als Korrelat apoptotischer neutrophiler Granulozyten beschrieben (Beinert et al. 2000), während aktivierte Granulozyten eine Herunterregulierung dieses Markers zeigten (Mollinedo et al. 1998). Auch das HEPB2 wird dem Zelltod zugeordnet – allerdings dem nekrotischen (Szigeti et al. 2006). Unter den herunterregulierten Proteinen fällt das 3-fach erniedrigte CAST auf. Durch die Inhibierung von Calpain wirkt es antiapoptotisch, was bereits auf neutrophilen Granulozyten genauer untersucht wurde (Squier et al. 1999). Eine Herunterregulierung dieses Proteins könnte also ebenso als ein proapoptotisches Zeichen interpretiert werden. Gleiches gilt für PSMA5 und „Thioredoxin-related transmembrane protein 1“ (TMX1). Zu diesen Proteinen gibt es diesbezüglich allerdings in der Literatur sehr wenig Vorbeschriebenes. RTN3 demgegenüber gilt als Induktor der Apoptose (Magrane and Uniprot Consortium 2011). Da auch RTN3 erniedrigt gemessen wurde, steht dies also gewissermaßen im Gegensatz zu den Ergebnissen der übrigen Apoptose-assoziierten Proteine, wenn man eine Herunterregulierung von RTN3 eher als proapoptotisches Zeichen wertet.

Bei Inflammationsreaktionen, zum Beispiel durch septische Pathogene, kommt es zu einer Neutrophilie im Blut. Dies geschieht durch eine schnelle Rekrutierung neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmark (Summers et al. 2010). Es werden zwar sowohl pro- als auch antiapoptotische Faktoren im Zuge der neutrophilen Inflammationsreaktion beeinflusst (McCracken and Allen 2014). Trotzdem ist insgesamt eher eine proapoptotische Tendenz und eine damit einhergehend verkürzte Lebensdauer neutrophiler Granulozyten beschrieben worden (Kennedy and DeLeo 2009).

Bei jenen Untersuchungen stand allerdings stets die nicht-sterile Inflammation im Fokus. Die sterile Inflammation, wie sie beim STEMI vorliegt, ist bisher nicht derart intensiv erforscht worden. Eine Neutrophilie ist allerdings auch dort zu beobachten. So wurde nach Durchführung einer TASH, bei welcher im klinischen Setting eine Myokardischämie und somit eine sterile Inflammation induziert wird, ein Anstieg neutrophiler Granulozyten bereits nach 15 Minuten beobachtet (Liebetrau et al. 2015). Dies deutet auf einen erhöhten Zellumsatz hin und legt nahe, dass auch bei der sterilen Inflammation eine Induktion der neutrophilen Apoptose stattfinden könnte. Kombiniert man dieses Ergebnis mit den in der vorliegenden Arbeit beobachteten Proteinalterationen, insbesondere der Erhöhung von CD53 und der Erniedrigung von CAST, lässt dies vermuten, dass sich

neutrophile Granulozyten bezüglich ihres apoptotischen Verhaltens im Rahmen des STE-MIs ähnlich verhalten im Vergleich zur bereits intensiv erforschten Reaktion im Rahmen der unsterilen Inflamationsantwort.

Immunantwort

Vor allem unter den erhöht gemessenen Proteinen können einige der detektierten Proteine in ihrer Funktion dem Immunsystem direkt zugeordnet werden. Als Ligand für I-8 ist der CXCR1 für die Stimulation neutrophiler Granulozyten extrem wichtig. Das Co-Chaperon CNPY3 scheint wichtig für die Synthese des TLR-Rezeptors zu sein und auch die ERAP1 ist durch ihre Beteiligung an der MHC-1-Produktion als Teil des Immunsystem anzusehen (Magrane and Uniprot Consortium 2011).

Allerdings finden sich mit WIPF1, WAS, und „Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 3“ (MAP2K3) auch unter den herunterregulierten Proteinen Immunsystem-assoziierte Proteine.

Insgesamt wurde also eine Beeinflussung des Immunsystem-assoziierten Proteoms bei Myokardinfarkt detektiert. Bestätigt wird dies durch die Analyse der regulierten Proteine bezüglich ihrer Involvierung in die biologischen Prozesse (Abbildung 19), wo jeweils größere Prozentsätze an Proteinen verschiedenen Immunsystem-assoziierten Prozessen zugeordnet wurden.

Signaltransduktion und Zellkommunikation

Mit CD53, CXCR1 und „Syntenin-1“ (SDCBP) lassen sich drei erhöhte Proteine klar Prozessen der Zellkommunikation zuordnen. Unter den erniedrigten Proteinen trifft dies allenfalls für PLEKHO2 zu, auch wenn zu diesem Protein aktuell sehr wenige Informationen vorhanden sind.

Die Zellkommunikation scheint also eine im Proteom der STEMI-Granulozyten überrepräsentierte Funktion zu sein. Dieses Ergebnis ist durchaus plausibel, bedenkt man die große Anzahl an beschriebenen neutrophilen Proteinen, die in Zell-Zell-Interaktion, Zell-Zell-Kommunikation und Zell-Zell-Signaltransduktion involviert sind (Ley et al. 2007; Phillipson and Kubes 2011). Das hochakute Krankheitsbild STEMI weist eine starke inflammatorische Komponente auf, was beispielsweise durch eine schnelle Hochregulierung diverser Entzündungsmarker oder auch durch die schnell einsetzende Granulozytose an sich bestätigt wurde (Liebetrau et al. 2015). Dass neutrophile Granulozyten, welche in ihrer Funktion maßgeblich von interzellulären Signaltransduktionsmechanismen geleitet

werden, bei STEMI-Patienten in ihrem Proteom die oben beschriebenen Veränderungen zeigen, ist somit ein Ergebnis, welches ihre physiologische Funktion gut widerspiegelt.

Vesikel- und Proteintransport

Bezüglich des Vesikel- und Proteintransportes finden sich sowohl unter den erhöhten, als auch unter den erniedrigten mehrere assoziierte Proteine. Bei den erhöhten Proteinen waren insgesamt 31,3 % der Proteine in den Proteintransport involviert. SDCBP ist eines der Vertreter. In neutrophilen Granulozyten wurde dieses Protein bisher allerdings wenig untersucht. Unter den erniedrigten Proteinen findet sich beispielsweise die NSF. Auch zu diesem Protein ist bisher sehr wenig beschrieben.

Insgesamt scheinen also in den Vesikel- und Proteintransport involvierte Proteine bei den STEMI-Granulozyten einer verstärkten Regulation zu unterliegen. Eine Erklärung könnte die Aktivierung neutrophiler Granulozyten im Rahmen der STEMI-induzierten sterilen Inflammation sein. Intrazelluläre Vesikel spielen eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion, im Rahmen welcher sie Proteine in die neutrophile Zellmembran einbauen (Kolaczowska and Kubes 2013). Da Zelladhäsionsprozesse bei der Ausübung ihrer pathophysiologischen Funktion essenziell sind für neutrophile Granulozyten (Ley et al. 2007), dürfte auch eine vermehrte Regulation von Vesikeln und damit einhergehend Vesikel-assoziierten Proteinen in diesen Kontext zu stellen sein.

5.4 Proteomische Analyse in vitro stimulierter neutrophiler Granulozyten

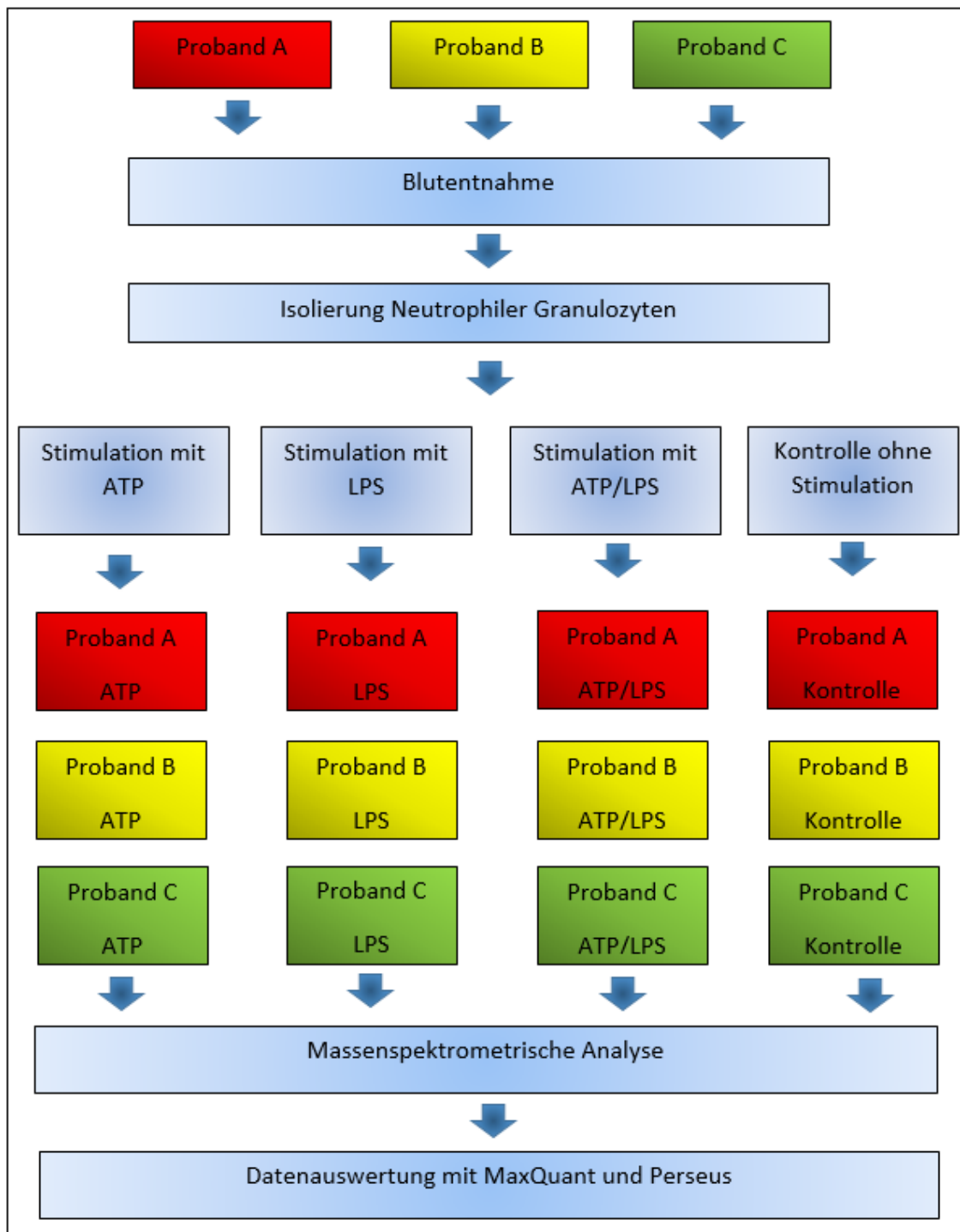


Abbildung 38 Versuchsübersicht der in vitro-Versuche

5.4.1 ATP-Stimulation

Eine Assoziation von drei der vier erhöhten Proteine mit der Kategorie „Stimulusantwort“ legt auch bei einer so geringen Anzahl von Proteinen nahe, dass die Stimulation durch ATP diesbezüglich einen Einfluss auf das Proteom der Zellen hatte. Besonders CALM

spielt bezüglich des Immunsystems, der Zellaktivierung und der Zell-Zell-Kontakte eine wichtige Rolle und ist in zahlreiche weitere biologische Prozesse involviert.

5.4.2 LPS-Stimulation

Mit MARCKS und ICAM1 sind zwei der vier erhöhten Proteine in Zellmotilitäts- und Zellkommunikationsprozesse involviert. Durch die Stimulation mit LPS wurde also die Aktivierungskaskade (Kapitel 1.1.1) im Proteom der neutrophilen Granulozyten getriggert.

Wie vorher beschrieben, ließen sich mittels Analysesoftware biologische Prozesse herausfiltern, die dem Immunsystem zugeordnet werden konnten. Dazu zählen zum einen die sechs identifizierten Immunglobulin-Ketten. Weiterhin fällt in dieser Kategorie das stark erniedrigte SELL auf, welches für die Adhäsion neutrophiler Granulozyten an Endothelzellen und weitere Prozesse der Aktivierungskaskade essentiell ist. Wenn auch wenig bekannt ist über dieses Protein, wird ebenfalls das „C-type lectin domain family 4 member D“ (CLEC4D) in seiner physiologischen Funktion hauptsächlich immunologischen Prozessen zugeordnet (Magrane and Uniprot Consortium 2011). Es waren also die betreffenden immunologischen Prozesse entweder herunterreguliert, oder diese Proteine wurden im Rahmen der Reaktion auf die Stimulanz LPS verstärkt sezerniert und verbraucht. Letzteres scheint wahrscheinlicher, da LPS als bekannter Aktivator von neutrophilen Granulozyten gilt (Hornung et al. 2008) und somit eine Herunterregulierung Immunsystem-assoziiierter Proteine ein gegensätzliches Ergebnis wäre. Trotzdem ließen sich diese beiden Möglichkeiten nur durch eine dynamische transkriptomische Analyse der betreffenden Gene einander gegenüberstellen.

Ein überraschendes Ergebnis war die Detektion der schweren Ketten aller vier Subtypen von Immunglobulin G und der schweren Ketten der beiden Immunglobulin A-Subtypen. Diese Proteine werden von B-Lymphozyten und den aus ihnen resultierenden Plasmazellen produziert. In der Literatur ließen sich keine Hinweise dafür finden, dass jemals diese Proteine selber in neutrophilen Granulozyten gefunden wurden. Eine Verunreinigung durch B-Zellen ist unwahrscheinlich, da dies im Vorhinein mittels Puritymessung durch FACS-Analyse ausgeschlossen wurde. Es ist somit unklar, wie es zu diesem Ergebnis kam. Um eine sichere Interpretation dieser Ergebnisse tätigen zu können, bedürfte es insgesamt weitergehender validierender Untersuchungen.

Fünf erniedrigte Proteine stehen im Zusammenhang mit apoptotischen Prozessen. „Protein-methionine sulfoxide oxidase MICAL1“ (MICAL1), „Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial“ (PRDX3) und „Matrix metalloproteinase-9“ (MMP9) werden dabei antiapoptotische Funktionen beigemessen. „Protein PML“ (PML) und „Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D3“ (UBE2D3) demgegenüber scheinen eher Apoptose-induzierend zu wirken. Ein klar pro- oder antiapoptotischer Proteomshift ist also nicht ersichtlich. Es ist aber davon auszugehen, dass bei einer Involvierung mehrerer Proteine in entsprechende zellphysiologische Prozesse die Apoptose bei den LPS-Stimulationsversuchen auf proteomischer Ebene beeinflusst wurde.

5.4.3 ATP/ LPS-Kombinationsstimulation

Alle drei erhöhten Proteine (MARCKS, ICAM1, DSC1) sind in Zell-Zell-Kontaktprozesse involviert. Proteine bezüglich Zelladhäsion und weiterer verwandter Prozesse der Zellkommunikation dominierten also insgesamt bei den ATP/ LPS-stimulierten Zellen.

In Analogie zu den LPS-Versuchen ließ sich mittels Softwareanalyse vor allem eine Involvierung vieler erniedrigter Proteine in immunologische Prozesse herausfiltern. Sechs der erniedrigten Proteine wurden dieser Kategorie zugeordnet. Die Kategorie „Apoptose“ war bei der ATP/ LPS-Kombinationsstimulation deutlich geringer vertreten als bei den LPS-Versuchen.

Auch bei der Kombinationsstimulation mit ATP und LPS fällt also auf, dass viele Immunsystem-assoziierte Proteine erniedrigt gemessen wurden. Das Apoptose-assoziierte Proteom war weniger durch die erniedrigten Proteine repräsentiert, als es bei den LPS-Versuchen der Fall war. Auch fanden sich fünf Immunglobulin-Ketten, bezüglich derer dieselben Überlegungen gelten, wie sie bei den LPS-Versuchen beschrieben wurden.

5.4.4 Bezug gesamtproteomischer Veränderungen der in vitro-Versuche

Die größte proteomische Ähnlichkeit bestand, abgesehen von einer Ausnahme, zwischen den Proben, welche von jeweils demselben Probanden stammten (Abbildung 22). Bestätigt wurden diese Beobachtungen durch die Intensitätsverteilungen in der Clusteranalyse, wo die zu jeweils einem Probanden gehörigen Proben miteinander die meiste Ähnlichkeit zeigten. Zum einen spricht dieses Ergebnis für eine gute Proben- und Prozessqualität. Ähnliche gemessene Proteinsignale innerhalb eines Probanden sprechen für methodische

Sauberkeit und somit geringe versuchsbedingte Schwankungen und Verunreinigungen. Zum anderen lässt sich ableiten, dass keine generelle Verschiebung im Proteinmuster durch die Stimulanzen stattfand, sondern Effekte auf einzelne Proteine oder Proteingruppen beschränkt waren.

Durch eine kombinierte Stimulierung der neutrophilen Granulozyten mit ATP und LPS konnte insgesamt der größte Einfluss auf die Zellen ausgeübt werden (Abbildung 31). Die Anwendung mehrerer Stimulanzen gleichzeitig hatte also stärkeren Einfluss auf die Zellen und ihr Proteom. Bei der LPS-Stimulation waren ungefähr doppelt so viele Proteine reguliert im Vergleich zur ATP-Stimulation.

5.5 Vergleich der sterilen und septischen Inflamationsreaktion neutrophiler Granulozyten

Viele sterile und septische Stimuli (PAMPs und DAMPs) wurden bereits identifiziert und erforscht. Der Fokus lag dabei meist darauf, Erkenntnisse zu gewinnen, ob und wie neutrophile Granulozyten durch die verschiedenen Liganden aktiviert werden. PAMPs und DAMPs können an dieselben Rezeptoren binden und somit gleiche neutrophile Immunreaktionen auslösen (Kolaczowska and Kubes 2013). Allerdings gibt es zunehmend Hinweise darauf, dass neutrophile Granulozyten auf verschiedene Stimuli different reagieren können. So wurden Rezeptoren identifiziert, welche, je nach Ligand, unterschiedliche Reaktionen gegenüber sterilen und unsterilen Stimuli induzierten (Liu et al. 2009; Ye et al. 2009). Dies legt nahe, dass eine starre Aktivierung neutrophiler Granulozyten, unabhängig vom Stimulus, eine zu einfache Vorstellung ist, sondern dass sie zwischen steriler und septischer Inflammation unterscheiden können und ihnen dynamische Reaktionsmechanismen auf die verschiedenen Inflammationstypen zur Verfügung stehen.

Die Ergebnisse der Stimulationsversuche der vorliegenden Arbeit stützen diese Hypothese. Es wurde LPS (PAMP) als Induktor der unsterilen (beispielsweise bakteriellen) Inflamationsreaktion und ATP (DAMP) als Induktor einer sterilen Inflamationsreaktion (beispielsweise im Rahmen der myokardialen Ischämie beim STEMI) ausgewählt. Bei den LPS-stimulierten Zellen fallen beispielsweise ICAM1, MARCKS und SELL auf, welche in Zellmigrationsprozesse involviert sind. MMP9 ist an der Produktion proteolytischer Substanzen beteiligt. Weitere Proteine, darunter etwa CLEC4D, sind klassischer-

weise Teil der Immunantwort. Somit waren nach LPS-Stimulation viele Proteine reguliert, welche an Immun- und Aktivierungskaskaden beteiligt sind. Eine derart vermehrte Regulierung entsprechender Stoffwechselwege war nach ATP-Stimulierung nicht zu vermerken. Lediglich CALM, welches nach ATP-Stimulation reguliert war, ist ein Protein, welches typischerweise der Immunantwort zugeordnet wird.

Die einzelnen regulierten Proteine der stimulierten Zellen wiesen also insgesamt keinerlei Übereinstimmungen zwischen den beiden Versuchsreihen auf. Die durch diese beiden Stimulanzen induzierten zellphysiologischen Reaktionen der neutrophilen Granulozyten waren somit unterschiedlich. Die in den mit LPS-stimulierten Zellen regulierten Proteine zeigten vermehrt Assoziationen mit klassischen Stoffwechselwegen der Immunantwort und der Zellaktivierung, während die durch ATP regulierten Proteine heterogenere Eigenschaften hatten. Es lässt sich daraus schließen, dass die klassischen Aufgaben neutrophiler Granulozyten im Rahmen ihrer Funktion als Abwehrzellen durch die LPS-induzierten proteomischen Veränderungen deutlich repräsentiert wurden. Dies war bei den ATP-stimulierten Zellen nicht der Fall. Dort scheinen zum einen andere zellpathophysiologische Funktionen eine Rolle gespielt zu haben. Zum anderen scheinen die durch die regulierten Proteine ausgeübten Funktionen heterogener und vielfältiger gewesen zu sein als bei den LPS-stimulierten Zellen.

Auch bei der Gesamtanalyse der biologischen Prozesse (Abbildung 32) fällt auf, dass den Kategorien Immunantwort und Abwehr prozentual weniger regulierte Proteine bei den ATP-stimulierten Zellen zugeordnet wurden als bei der LPS-Stimulation. Gegenüber der simulierten sterilen Inflammation wurden Immun- und Abwehrprozesse also in geringerem Maße aktiviert im Gegensatz zur simulierten septischen Inflammation.

Die Erkenntnisse aus der Analyse der biologischen Prozesse legen insgesamt nahe, dass neutrophile Granulozyten in Gegenwart von DAMPs und PAMPs auf verschiedene Art und Weise und somit jeweils spezialisiert reagieren, was Vermutungen anderer Autoren (Kolaczowska and Kubes 2013) weiter stützt. Klassische Funktionen neutrophiler Granulozyten als Immunzellen spiegeln sich in den durch LPS-Stimulierung erwirkten proteomischen Alterationen wider. Nach ATP-Stimulierung scheinen andere Prozesse vermehrt reguliert gewesen zu sein. Spezifische Stoffwechselwege oder biologische Prozesse lassen sich dort nicht erkennen.

Weitere Unterschiede zwischen der Reaktion auf ATP und LPS ergibt die rein quantitative Betrachtung der regulierten Proteine. Nach LPS-Stimulation waren deutlich mehr Proteine reguliert. Der Einfluss von LPS auf das Proteom der Granulozyten scheint also größer gewesen zu sein als der von ATP. Dies wurde dadurch bestätigt, dass die ATP/LPS-Proben deutlich mehr Überschneidungen mit den reinen LPS-Proben zeigten, als mit den reinen ATP-Proben (Abbildung 31). LPS scheint auf zellphysiologischer Ebene als effektiveres Stimulanz fungiert und somit durch eine verstärkte Aktivierung zellulärer Prozesse einen größeren Proteomshift in den Zellen bewirkt zu haben. Die Kombinationsstimulation mit ATP und LPS schien dabei noch weitere, beim Vergleich mit den Einzelstimulationen nicht direkt ableitbare, Proteomveränderungen induziert zu haben. Zwar stimmte die Anzahl regulierter Proteine rein numerisch grob überein mit der Summe der regulierten Proteine aus den beiden Einzelstimulationen mit ATP und LPS. Allerdings war, auch wenn es Überschneidungen gab, der größere Anteil regulierter Proteine in den ATP/LPS-Versuchen nur dort reguliert. Umgekehrt waren in den einzeln mit ATP oder LPS stimulierten Zellen die meisten Proteine jeweils nur dort und nicht auch bei der Kombinationsstimulation reguliert. Die Kombination aus ATP und LPS schien also einerseits eine signifikante Hochregulierung (oder verminderte Sezernierung) gewisser Proteine ausgelöst zu haben, die bei den Einzelstimulationen nicht vorlag, was auf einen synergistischen Effekt von ATP und LPS hinweist. Andererseits scheinen sich ATP- und LPS-Stimulation an manchen Stellen gegensätzlich beeinflusst zu haben, sodass manche Proteine zwar in den Einzelstimulationsversuchen reguliert waren, bei der Kombination jedoch nicht. Deutlich wird dieser antagonistische Effekt auch dadurch, dass die absolute Zahl der erhöht identifizierten Proteine bei der ATP/LPS-Kombination niedriger ausfiel (3) als bei den beiden Einzelstimulationsversuchen (jeweils 4).

Der quantitative Vergleich der regulierten Proteine legt also ebenfalls nahe, dass LPS und ATP verschiedene zelluläre Antworten in den neutrophilen Granulozyten induzierten. Auch dies deutet darauf hin, dass neutrophilen Granulozyten spezialisierte Reaktionsmechanismen gegenüber DAMPs und PAMPs zu Verfügung stehen. Dass der Einfluss von LPS zu mehr proteomischen Veränderungen führte, kann verschiedene Ursachen haben. Geht man davon aus, dass die Abwehr von körperfremden Pathogenen die Schlüsselaufgabe neutrophiler Granulozyten darstellt, ist es wahrscheinlich, dass LPS als klassisches DAMP eine starke Aktivierung von neutrophilen Granulozyten initiiert hat mit entsprechenden proteomischen Veränderungen. Im Umkehrschluss könnte im Rahmen der steri-

len Inflammation die Aktivierung weniger intensiv ausfallen, da die pathophysiologischen Reaktionsmechanismen neutrophiler Granulozyten nur teilweise auf diese Situation ausgelegt sind. Dies könnte bei der ATP-Stimulation zu geringeren proteomischen Veränderungen geführt haben.

Zusammenfassend riefen ATP und LPS sowohl qualitativ als auch quantitativ unterschiedliche proteomische Veränderungen in den neutrophilen Granulozyten hervor. LPS erwirkte bei den Versuchen deutlich mehr proteomische Veränderungen als ATP.

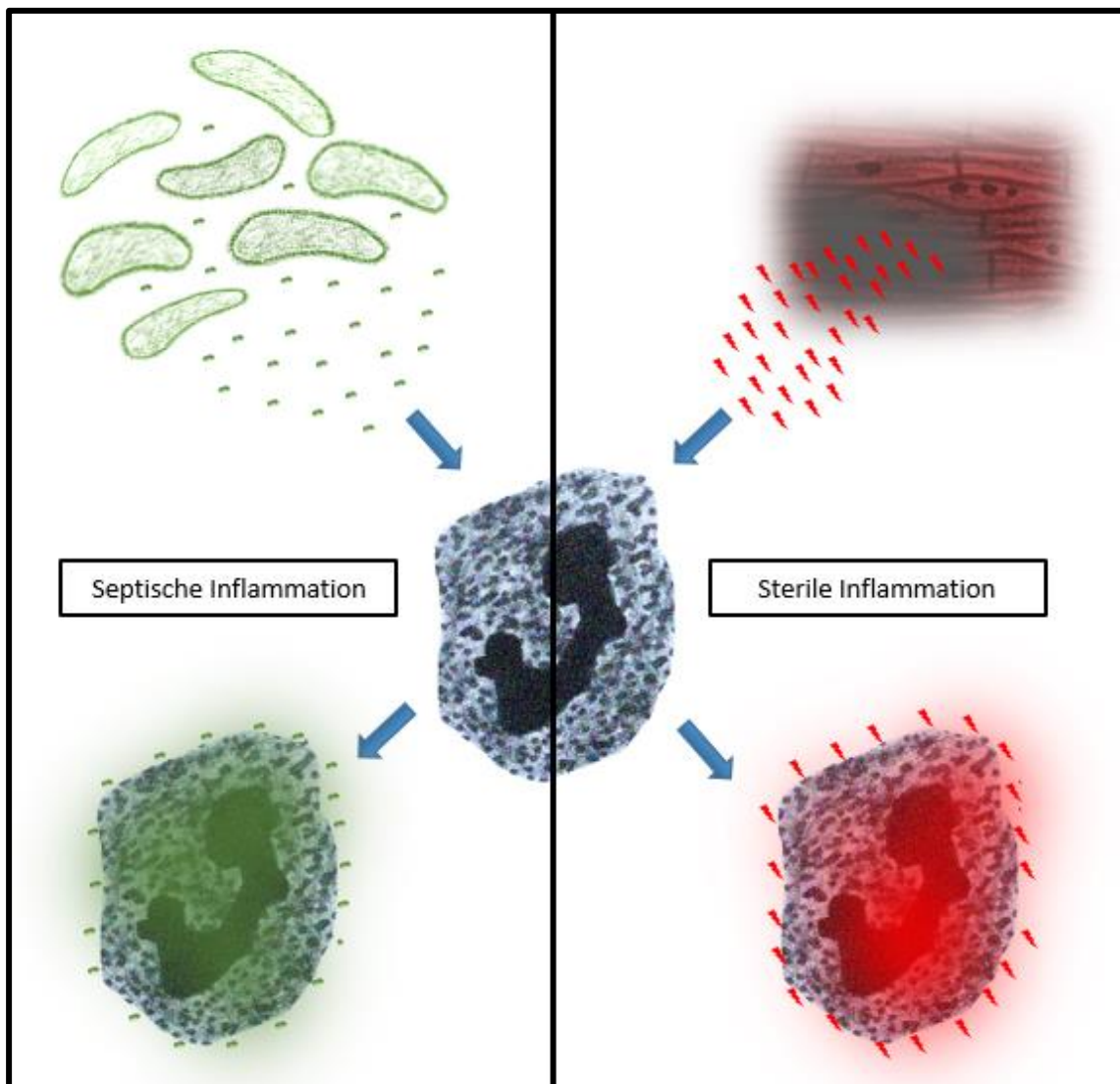


Abbildung 39 Vergleich der septischen und der sterilen Inflamationsreaktion. Neutrophile Granulozyten reagieren auf septische (hier LPS aus der bakteriellen Zellwand) und sterile (hier freigesetztes ATP aus ischämischen Kardiomyozyten) Stimuli mit verschiedenartigen proteomischen Veränderungen

Diese Ergebnisse legen insgesamt nahe, dass neutrophile Granulozyten zwischen steriler und septischer Inflammation unterscheiden und auf diese mit verschiedenen zellpathophysiologischen Antworten reagieren (Abbildung 39). Dies untermauert Erkenntnisse aus

Arbeiten, in welchen bereits die Möglichkeit unterschiedlicher neutrophiler Reaktionen auf PAMPs und DAMPs vermutet wurden (s. Kapitel 1.1.2; Liu et al. 2009, Ye et al. 2009).

Die bei LPS-stimulierten neutrophilen Granulozyten prozentuale Mehrpräsenz von regulierten Proteinen, welche in Immunantwort und Abwehr involviert sind, suggeriert, dass diese klassischen Aufgaben neutrophiler Granulozyten eher bei der septischen Inflamationsreaktion, im Rahmen des Erkennens und Bekämpfens körperfremder, schädigender Einflüsse von außen, eine Rolle spielen. LPS induzierte zudem auch absolut einen deutlicheren Proteomshift, was darauf hindeutet, dass neutrophile Granulozyten durch die septische Inflammation stärker stimuliert und aktiviert werden als durch die sterile Inflammation.

Bei der sterilen Inflammation könnten im Umkehrschluss andere biologische Prozesse relevanter sein. Denkbar wäre dabei die Beseitigung von Zelltrümmern (Kolaczowska and Kubes 2013) oder die Beteiligung an der Regeneration von Gewebe nach etwa einer myokardialen Ischämie. Die Funktionen schienen dabei weit gefächert zu sein, da eine Tendenz zu bestimmten biologischen Prozessen nicht vorlag. Auch war der Proteomshift insgesamt nicht so ausgeprägt im Vergleich zum Proteomshift nach LPS-Stimulation, was auf einen geringeren Einfluss durch ATP hindeutet. Dies weist darauf hin, dass neutrophile Granulozyten durch die Reaktion auf externe Stimuli, wie etwa eine bakterielle Infektion, stärker aktiviert werden, als durch endogene, sterile Stimuli.

5.6 Vergleich der Ergebnisse der in vivo- und in vitro-Versuche

Zieht man den Vergleich zwischen der STEMI-Analyse und den Stimulationsversuchen, lassen sich teils übereinstimmende Ergebnisse verzeichnen. So waren bei beiden Versuchen die Zellkompartimente und die biologischen Prozesse ähnlich stark vertreten. Außerdem waren die interindividuellen proteomischen Unterschiede bei beiden Versuchsreihen maßgeblich, während Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen auf einzelne regulierte Proteine beschränkt waren.

Bei der qualitativen Analyse einzelner regulierter Proteine konnten demgegenüber nur sehr wenige Überschneidungen zwischen den beiden Ansätzen festgestellt werden. Dies gilt insbesondere für den Vergleich der ATP-stimulierten Granulozyten mit den STEMI-Granulozyten. Die ATP-Stimulierung konnte also hier die beim STEMI vorliegende ste-

rile Inflamationsreaktion nicht in einem Maße simulieren, das zu ähnlichen proteomischen Veränderungen in den Zellen geführt hätte. Als einzige Überschneidung sind die Erniedrigung des Proteins PSMA3 bei den ATP-stimulierten Granulozyten und die Erniedrigung des Proteins PSMA5 bei den STEMI-Granulozyten zu verzeichnen. Diese einzelne Übereinstimmung reicht allerdings nicht aus, um auf allgemeine Ähnlichkeiten in der pathophysiologischen Reaktion der Granulozyten zwischen den in vivo- und den in vitro-Versuchen schließen zu können.

Zu bedenken ist, dass eine Stimulierung mit ATP nur einen Aspekt unter vielen der sterilen Inflammation nachahmen konnte. Es existiert eine große Anzahl weiterer DAMPs, welche durch eine myokardiale Ischämie freigesetzt werden. Dazu zählen beispielsweise mitochondriale DNA und andere mitochondriale Bestandteile. Ein potentieller Einfluss dieser Faktoren, der zu bestimmten Veränderungen im Proteom der STEMI-Granulozyten geführt hat, kann bei den ATP-stimulierten Zellen nicht vorgelegen haben. Durch eine Wiederholung der Versuche mit Einsatz von weiteren einzelnen DAMPs und deren Kombination als Stimulanzien könnte man dem Ziel, die sterile Inflammation des Myokardinfarktes in vitro zu simulieren und auf diese Art und Weise weiter zu erforschen, in Zukunft vielleicht näher kommen.

5.7 Klinischer Bezug

Carbone et al. (2013) erläuterten in ihrem Review, dass neutrophile Granulozyten bei der Pathogenese des akuten Myokardinfarktes eine wichtige Rolle spielen. Ihre Erforschung in Bezug auf dieses Krankheitsbild habe also durchaus das Potential, für die Entwicklung neuer Therapiekonzepte oder bei diagnostischen Verfahren zukünftig eine Rolle zu spielen. Ein wichtiger Forschungsgegenstand dabei ist, ob neutrophile Granulozyten beim STEMI im Endeffekt protektiv oder dem Körper schädigend wirken (Carbone et al. 2013).

Die vermehrte Regulierung Immunsystem-assoziiierter Proteine bei den STEMI-Patienten kann zunächst als Bestätigung der Erkenntnisse gewertet werden, dass neutrophile Granulozyten als Immunzellen aktiv in das Infarktgeschehen mit eingreifen und bei der Pathogenese eine maßgebliche Rolle spielen. Die in dieser Arbeit erlangten Hinweise auf eine proapoptotische Tendenz der neutrophilen Granulozyten stellen eine Parallele zur septischen Inflamationsreaktion dar, wo eine beschleunigte Apoptose bereits beschrie-

ben wurde (Kennedy and DeLeo 2009). Dieses Ergebnis, in Kombination mit der bekannten Neutrophilie nach TASH (Liebetrau et al. 2015) deutet darauf hin, dass sich die Kinetiken der Reaktionen neutrophiler Granulozyten gegenüber der septischen Inflamationsreaktion und gegenüber jener im Rahmen des STEMIs ähneln.

Die Ergebnisse der Stimulationsversuche allerdings legen nahe, dass neutrophile Granulozyten auf sterile und unsterile Inflammationsstimuli different reagieren. Es gab dort keine Überschneidungen in den durch ATP und LPS ausgelösten Proteomveränderungen. Auch das Screening der Proteine hinsichtlich der biologischen Prozesse, in welche sie involviert sind, ergab entsprechende Hinweise. Ähnliche Vermutungen wurden bereits durch andere Autoren geäußert (Kolaczowska and Kubes 2013). Dies ist für das Verständnis der Rolle neutrophiler Granulozyten beim Myokardinfarkt und weiteren Krankheitsbildern, die mit sterilen Inflammationen einhergehen, bedeutsam. Denn wenn neutrophile Granulozyten auf einen sterilen Stimulus anders reagieren als auf einen unsterilen, ist dies ein Hinweis darauf, dass sie den beiden Inflammationstypen gegenüber spezialisierte Reaktionsmechanismen entwickelt haben. Dies wiederum spräche dafür, dass ihr Effekt bei der sterilen Inflammation und somit auch beim STEMI insgesamt protektiv für den Patienten ist. Denn eine spezialisierte Immunantwort auf die sterile Inflammation hätte sich evolutionsbiologisch nur bei vorhandenem Überlebensvorteil durchsetzen können.

Somit weisen die Ergebnisse dieser Arbeit insgesamt auf einen zumindest teilweise protektiven Effekt neutrophiler Granulozyten bei der sterilen Inflammation und beim STEMI hin. Würde sich dies im Rahmen weiterer Forschung bestätigen, könnten medikamentöse Einflussmöglichkeiten auf neutrophile Granulozyten therapeutisch eingesetzt werden. Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF, für engl. Granulocyte-Colony Stimulating Factor) könnte solch eine medikamentöse Option darstellen. G-CSF stimuliert die Proliferation und Aktivierung neutrophiler Granulozyten und wird beispielsweise zur Infektionsprophylaxe durch Chemotherapie-induzierte Neutropenie bei malignen Erkrankungen eingesetzt (Karow and Lang-Roth 2015). Bestätigten sich o.g. Vermutungen, könnte die Gabe von G-CSF zunächst bei neutropenen Patienten, welche an Erkrankungen mit einhergehender steriler Inflammation erkranken, getestet werden. Bei Erfolg könnte im Verlauf die Anwendung auch auf weitere Patienten, ungeachtet der Anzahl neutrophiler Granulozyten im Blut, erprobt werden.

Mehrere Arbeiten haben sich bereits mit der Modulation einzelner Signaltransduktionswege und deren Auswirkung auf das Outcome des STEMIs befasst. Durch beispielsweise

die Behandlung mit dem Protein „Evasin-3“, welches die CXC-vermittelte Infiltration ischämischen Myokardes durch neutrophile Granulozyten inhibiert, konnte bei Mäusen eine Reduktion von Infarktgröße und postischämischer Inflammation erwirkt werden (Montecucco et al. 2010). Neben einer derartigen Beeinflussung der reinen Anzahl oder der allgemeinen Aktivierung von neutrophilen Granulozyten könnten aber auch einzelne Stoffwechselwege gezielt moduliert werden. Auf diese Weise würde der Erkenntnis Rechnung getragen, dass neutrophile Granulozyten sowohl schädigend als auch protektiv auf das infarzierte Gewebe wirken (Carbone et al. 2013).

Eine protektive Wirkung ist beispielsweise die Auflösung des Inflamationsgebietes von Zelltrümmern (Fournier and Parkos 2012). Die vermehrte Regulierung von Proteinen involviert in Signaltransduktion/ Zellkommunikation und Vesikel-/ Proteintransport bei den neutrophilen Granulozyten aus den STEMI-Patienten dieser Arbeit könnte Korrelat dieser Funktion sein. AP1G1 und NSF beispielsweise sind an der Golgi-Prozessierung von Proteinen und Zellbestandteilen beteiligt und waren bei den STEMI-Granulozyten signifikant reguliert. Eine nähere Untersuchung ihrer genauen Rolle im Rahmen des STEMI könnte dazu führen, dass die entsprechenden Stoffwechselwege medikamentös getriggert werden könnten, was ihren positiven Effekt verstärken würde. Als weiteres Beispiel ist die Freisetzung von ROS zu nennen. Es gibt Hinweise darauf, dass diese dem Myokard schaden, die Infarktnarbe vergrößern und das Outcome des Myokardinfarktes insgesamt verschlechtern (Liehn et al. 2011). Könnte man durch gezielte Inhibierung der entsprechenden Stoffwechselwege die Freisetzung von neutrophilen ROS reduzieren, ohne jedoch die allgemeine Anzahl infiltrierender neutrophiler Granulozyten zu beeinflussen, könnte auch dies das Outcome verbessern. Protektive Stoffwechselwege der neutrophilen Granulozyten blieben dabei unbeeinträchtigt.

6 Zusammenfassung

Ziel der Arbeit: Bei neutrophilen Granulozyten sollten Änderungen im Proteom als Reaktion auf verschiedene Stimuli detektiert werden, um deren pathophysiologische Rolle – insbesondere im Rahmen des ST-Hebungs-Myokardinfarktes – näher zu erforschen.

Material und Methoden: Im Rahmen des ersten (in vivo-)Versuches wurden neutrophile Granulozyten von 3 STEMI-Patienten und 3 gesunden Kontrollen aus Vollblut isoliert. Im zweiten (in vitro-)Versuch wurden neutrophile Granulozyten von 3 gesunden Probanden aus Vollblut isoliert und anschließend jeweils, nebst Kontrollen, mit ATP, LPS und der Kombination aus ATP und LPS stimuliert. Anschließend wurden die in den neutrophilen Granulozyten enthaltenen Proteine mit der Protease Trypsin verdaut. Die daraus resultierenden Peptide wurden in einem Massenspektrometer (LTQ Orbitrap) analysiert und anschließend ausgewertet. So konnten quantitative Rückschlüsse auf die einzelnen in den neutrophilen Granulozyten enthaltenen Proteine gezogen und relative Veränderungen zwischen den Proben berechnet werden.

Ergebnisse: In vivo konnten 2059 Proteine identifiziert werden, von welchen 34 Proteine signifikant reguliert waren. Bei den In vitro-Stimulationsversuchen wurden insgesamt 2599 Proteine identifiziert. Signifikant reguliert gegenüber den Kontrollen waren dabei 9 (ATP), 22 (LPS) und 29 (ATP/ LPS) Proteine. Die ATP- und LPS-Versuche zeigten keine proteomischen Überschneidungen. Zwischen den in-vivo und in vitro-Versuchen gab es minimale proteomische Überschneidungen.

Diskussion: Bei STEMI-Granulozyten war ein proapoptotischer Proteomshift zu verzeichnen. Weiterhin waren Proteine der Immunantwort, der Zell-Zell-Kommunikation und des Vesikel- und Proteintransportes verstärkt reguliert. Dies bestätigt neutrophile Granulozyten als Immunzellen und legt nahe, dass sie aktiv in das Infarktgeschehen eingreifen und dabei eine maßgebliche Rolle spielen.

Die Ergebnisse der Stimulationsversuche zeigten, dass ATP und LPS auf proteomischer Ebene verschiedene Veränderungen in neutrophilen Granulozyten hervorriefen. Dies ist ein Zeichen dafür, dass neutrophile Granulozyten zwischen PAMPs (LPS) und DAMPs (ATP) unterscheiden und auf die septische und die sterile Inflammation jeweils spezialisiert reagieren können. Im Rahmen der simulierten septischen Inflammation waren dabei klassische Immun- und Abwehrprozesse stärker reguliert als nach ATP-Stimulation. Dies spricht dafür, dass die neutrophile Immunantwort auf septische Zustände stärker ausfällt als gegenüber sterilen Stimuli.

7 Summary

The aim of this work was to detect alterations in the proteome of neutrophil granulocytes by means of various stimuli in order to investigate their pathophysiological role - particularly in the context of the ST elevation myocardial infarction (STEMI).

Materials and methods: For the first trial (in vivo), neutrophils were isolated from whole blood of 3 STEMI patients and 3 healthy controls. For the second trial (in vitro), neutrophils were isolated from whole blood of 3 healthy controls and afterwards each sample was divided up and incubated separately with either adenosine triphosphate (ATP), lipopolysaccharides (LPS) or a combination of ATP/ LPS as stimuli, or kept without stimulation (control). The proteins of these neutrophils were digested into peptides using the protease trypsin and then measured with a mass spectrometer (LTQ Orbitrap) and subsequently analyzed. This way, quantitative information relating to several neutrophil proteins could be obtained and fold changes could be evaluated.

Results: In vivo, 2059 proteins were identified. 34 of them showed a significantly higher or lower intensity in the STEMI patients. In vitro, 2599 proteins were identified, of which 9 (ATP), 22 (LPS) and 29 (ATP/ LPS) varied significantly in comparison to the controls. Between the ATP and LPS trial no proteomic overlaps could be found. Between in vivo and in vitro trials there were minimal proteomic overlaps.

Discussion: In the neutrophils of STEMI-patients we detected a pro-apoptotic proteome shift. Furthermore, proteins participating in the immune answer, cell-cell communication and vesicle and protein transportation were regulated. This confirms the neutrophils' role as cells of the immune system but also suggests their active participation and an important role in the process of myocardial infarction.

The results of the stimulation trials showed that ATP and LPS induced different proteomic shifts within neutrophils. This suggests their ability to differentiate between pathogen-associated molecular patterns (PAMPs - here: LPS) and danger/ damage-associated molecular patterns (DAMPs - here: ATP) and to react in a specialized way to sterile and septic inflammation. In simulated septic inflammation, immune system and defence associated processes were regulated more significantly than in simulated sterile inflammation. This suggests that the neutrophil immune response in septic inflammation is more pronounced than in sterile inflammation.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ABC	Ammoniumbicarbonat
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
ACS	Akutes Koronarsyndrom
ATP	Adenosintriphosphat
CCD	Charge-coupled Device
CD	Cluster of Differentiation
CO₂	Kohlenstoffdioxid
Ctrl	Kontrolle
Ctrl	Kontrolle
DAMPs	damage/ danger associated molecular patterns
ddH₂O	Deionisiertes/ doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
ESI	Elektrospray-Ionisierung
EtOH	Ethanol
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FSC	Forward Scatter
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor (Granulozyten-Kolonie stimulierende Faktor)
GO	Gene Ontology
GOBP	Gene Ontology Biological Process
GOCC	Gene Ontology Cellular Compartment
GOMF	Gene Ontology Molecular Function
GOrrilla	Gene Ontology enRIchment anaLysis and visuaLizAtion tool
h	Stunde
H₂O	Wasser
HAc	Essigsäure

HCl	Hydrogenchlorid (Chlorwasserstoff)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IAA	Iodacetamid
IL	Interleukin
KHK	Koronare Herzkrankheit
LC	Liquid Chromatography
LFQ	Label-free quantification (Markierungsfreie massenspektrometrische Quantifizierung)
Log	Logarithmus
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg	Lösung
Lsg.	Lösung
LTQ	Linear Trap Quadrupole
m/z	Masse-durch-Ladungs-Verhältnis
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie, Massenspektrometer
NaCl	Natriumchlorid
NETs	neutrophil extracellular traps
NSTEMI	Nicht-ST-Hebungs-Myokardinfarkt
PAMPs	pathogen associated molecular patterns
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells; Lymphozyten und Monozyten
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PMN	Polymorphonuclear Cells; Granulozyten
PTCA	Perkutane transluminale Koronarangioplastie
rcf	relativen Zentrifugalbeschleunigung
ROS	reactive oxygen species
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
RT	Raumtemperatur
SILAC	stable isotope labeling with amino acids in cell culture

SSC	Side Scatter
SDS	sodium dodecyl sulphate (Natriumdodecylsulfat)
SSC	Side Scatter
STAGE-Tip	Stop and Go Extraction Tip
STEMI	ST-elevation myocardial infarction (ST-Hebungs-Myokardinfarkt)
Tab.	Tabelle
TASH	Transkoronare Ablation der Septumhypertrophie
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tube	5 ml Falcon Round-Bottom Polystyrene Tube™ (BD)
vgl.	vergleiche

Tabelle 11 Abkürzungsverzeichnis

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Aktivierungskaskade neutrophiler Granulozyten (verändert nach (Ley et al. 2007))	2
Abbildung 2 Dextran-Sedimentation	23
Abbildung 3 Trennung der Granulozyten von restlichen Blutbestandteilen (modifiziert nach (Hoffmann 2013)).....	24
Abbildung 4 6-Well-Platten bei den Stimulationsversuchen	27
Abbildung 5 Überblick Herstellung der STAGE-Tips.....	29
Abbildung 6 Coomassie-gefärbtes Gel, auf welches das Proteinlysate aufgetragen wurde	32
Abbildung 7 Zerkleinerung des Gels	33
Abbildung 8 Überführung der Verdauungsprodukte in ein Referenz Reaktionsgefäß ...	36
Abbildung 9 STAGE-Tip	38
Abbildung 10 Beladung der STAGE-Tips	39
Abbildung 11 Aufbau des Massenspektrometers (stark vereinfacht; Abbildung nach (Olsen, Jesper V. et al 2009)).....	40
Abbildung 12 Beispiel für ein Ergebnis einer GOrilla-Analyse in der Kategorie „Molekulare Funktion“	45
Abbildung 13 Purity-Messung der isolierten Granulozyten. Exemplarisch ist hier Proband A (aus einem der in vitro-Versuche) dargestellt	46
Abbildung 14 Aufteilung der identifizierten Proteine nach ihrer Zugehörigkeit zu den Zellkompartimenten mittels Gene Ontology-Analyse. Mit Rest bezeichnet ist der Anteil an Proteinen, der nicht mit den Go-Termini „Nucleus“, „Zytosol“, „Plasmamembran“ oder „Extrazellularraum“ versehen ist. „Unbekannt“ bedeutet, dass eine Zuordnung durch die GOCC-Datenbank nicht vorliegt.....	48
Abbildung 15 Hierarchische Clusteranalyse und Dendrogramm.....	49
Abbildung 16 Streudiagramm. Übersicht der LFQ-Intensitäten aller Proben (als log[2]). Jede Probe wurde gegen alle anderen Proben aufgetragen. Jeder Punkt entspricht dabei einem detektierten Protein.....	50
Abbildung 17 Volcano Plot. Detektierte Proteine bei STEMI-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen	52
Abbildung 18 Anteil an detektierten Proteinen, der dem jeweiligen biologischen Prozess zugeordnet ist. Die Zuordnung erfolgte anhand der Gene Ontology-Datenbank	53

Abbildung 19 Anteil an detektierten Proteinen, der dem jeweiligen biologischen Prozess zugeordnet ist. Aufgeführt sind hoch- und herunterregulierte Proteine im Vergleich. Die Zuordnung erfolgte anhand der Gene Ontology-Datenbank.....	54
Abbildung 20 Aufteilung der identifizierten Proteine nach ihrer Zugehörigkeit zu den Zellkompartimenten mittels Gene Ontology-Analyse. Mit Rest bezeichnet ist der Anteil an Proteinen, der nicht mit den Go-Termini „Nucleus“, „Zytosol“, „Plasmamembran“ oder „Extrazellularraum“ versehen ist. „Unbekannt“ bedeutet, dass eine Zuordnung durch die GOCC-Datenbank nicht vorliegt.....	60
Abbildung 21 Anteil an detektierten Proteinen, der dem jeweiligen biologischen Prozess zugeordnet ist. Die Zuordnung erfolgte anhand der Gene Ontology-Datenbank	61
Abbildung 22 Hierarchische Clusteranalyse und Dendrogramm.....	62
Abbildung 23 Volcano Plot der Proteine bei den ATP-stimulierten neutrophilen Granulozyten	63
Abbildung 24 Biologische Prozesse der regulierten Proteine bei den ATP-stimulierten neutrophilen Granulozyten	64
Abbildung 25 Volcano Plot der Proteine bei den LPS-stimulierten neutrophilen Granulozyten	66
Abbildung 26 Biologische Prozesse der regulierten Proteine bei den LPS-stimulierten neutrophilen Granulozyten.....	68
Abbildung 27 GOrilla-Analyse der erniedrigten Proteine in der Kategorie „Biologischer Prozess“ (Überblick)	69
Abbildung 28 Vergrößerter Ausschnitt aus Abbildung 27.....	69
Abbildung 29 Volcano Plot der Proteine bei den ATP/ LPS-stimulierten neutrophilen Granulozyten	71
Abbildung 30 Biologische Prozesse der regulierten Proteine bei den ATP/ LPS-stimulierten neutrophilen Granulozyten.....	73
Abbildung 31 Überschneidungen der signifikant reguliert gemessenen Proteine zwischen den drei Versuchen. Genannt sind die Namen der für die Proteine kodierenden Gene. In den Überschneidungsflächen sind jene Proteine aufgeführt, welche in den beiden angrenzenden Versuchen reguliert gemessen wurden	75
Abbildung 32 Biologische Prozesse im Vergleich.....	76
Abbildung 33 Übersicht der Versuche dieser Arbeit: Im Rahmen der Stimulationsversuche (I) wurden neutrophile Granulozyten von Probanden isoliert und anschließend mit ATP, LPS und ATP/ LPS stimuliert. Im Rahmen der in vivo-Versuche	

(II) wurden neutrophile Granulozyten von STEMI-Patienten isoliert (a). Es folgte der In-Gel-Verdau und die Aufladung der daraus resultierenden Peptide auf STAGE-Tips (b). Die massenspektrometrischen Messungen (c) lieferten Rohdaten, welche mittels Analysesoftware ausgewertet wurden (d) und zu Ergebnissen führten, die Aussagen über Konzentrationsunterschiede zwischen den verschiedenen Proben bezüglich der gefundenen Proteine zuließen. Für beide Versuchsreihen (I und II) wurden Vergleichsproben als Kontrollen angelegt (in diesem Schema nicht aufgeführt).....	77
Abbildung 34 Prozentualer Anteil an Proteinen, die bei den Versuchen dieser Arbeit und denen von Tomazella et al. (2009) dem entsprechenden Zellkompartiment zugeordnet sind	82
Abbildung 35 Zugehörigkeit der detektierten Proteine zu den Zellkompartimenten. Zum Vergleich sind die Ergebnisse von Zhou et al. (2013) und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit aufgeführt	83
Abbildung 36 Versuchsübersicht der in vivo-Versuche	84
Abbildung 37 Vergleich der Involvierung in verschiedene biologische Prozesse (in Prozent) der Arbeit von Tomazella et al. (2009) mit der vorliegenden Arbeit	85
Abbildung 38 Versuchsübersicht der in vitro-Versuche	90
Abbildung 39 Vergleich der septischen und der sterilen Inflamationsreaktion. Neutrophile Granulozyten reagieren auf septische (hier LPS aus der bakteriellen Zellwand) und sterile (hier freigesetztes ATP aus ischämischen Kardiomyozyten) Stimuli mit verschiedenartigen proteomischen Veränderungen	96

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Liste aller verwendeten Chemikalien, Lösungen, Antikörper und Kits	12
Tabelle 2 Liste aller verwendeten laboratorischen Verbrauchsmaterialien	13
Tabelle 3 Liste aller verwendeten Geräte.....	15
Tabelle 4 Liste aller verwendeten Softwares und Programme.....	15
Tabelle 5 Liste wichtiger Puffer- und Lösungsprotokolle	20
Tabelle 6 Signifikant erhöht gemessene Proteine bei STEMI-Granulozyten	55
Tabelle 7 Signifikant erniedrigte Proteine bei STEMI-Granulozyten	57
Tabelle 8 Signifikant regulierte Proteine bei den ATP-stimulierten neutrophilen Granulozyten	64
Tabelle 9 Signifikant regulierte Proteine bei den LPS-stimulierten neutrophilen Granulozyten	67
Tabelle 10 Signifikant regulierte Proteine bei den ATP/ LPS-stimulierten neutrophilen Granulozyten	72
Tabelle 11 Abkürzungsverzeichnis	105

11 Literaturverzeichnis

- Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A (2012) Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. *Annu. Rev. Immunol.* 30(1):459–489. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-074942
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.* 25(1):25–29. doi: 10.1038/75556
- Avanzas P, Quiles J, de Sá, Esteban López, Sánchez A, Rubio R, García E, López-Sendón JL (2004) Neutrophil count and infarct size in patients with acute myocardial infarction. *International Journal of Cardiology* 97(1):155–156. doi: 10.1016/j.ijcard.2003.06.028
- Bauernfeind F, Ablasser A, Bartok E, Kim S, Schmid-Burgk J, Cavlar T, Hornung V (2011) Inflammasomes: current understanding and open questions. *Cell. Mol. Life Sci.* 68(5):765–783. doi: 10.1007/s00018-010-0567-4
- Beinert T, Münzing S, Possinger K, Krombach F (2000) Increased expression of the tetraspanins CD53 and CD63 on apoptotic human neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology* 67(3):369–373
- Borregaard N (2010) Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity* 33(5):657–670. doi: 10.1016/j.immuni.2010.11.011
- Bouter A, Carneille R, Gounou C, Bouvet F, Degrelle SA, Evain-Brion D, Brisson AR (2015) Review: Annexin-A5 and cell membrane repair. *Placenta* 36 Suppl 1:S43-9. doi: 10.1016/j.placenta.2015.01.193
- Braunwald E (1989) Unstable angina. A classification. *Circulation* 80(2):410–414. doi: 10.1161/01.CIR.80.2.410
- Brown GR, Hem V, Katz KS, Ovetsky M, Wallin C, Ermolaeva O, Tolstoy I, Tatusova T, Pruitt KD, Maglott DR, Murphy TD (2015) Gene: a gene-centered information resource at NCBI. *Nucleic Acids Res.* 43(Database issue):D36-42. doi: 10.1093/nar/gku1055
- Carbone F, Nencioni A, Mach F, Vuilleumier N, Montecucco F (2013) Pathophysiological role of neutrophils in acute myocardial infarction. *Thromb Haemost* 110(3):501–514. doi: 10.1160/TH13-03-0211

- Chen C-H, Budas GR, Churchill EN, Disatnik M-H, Hurley TD, Mochly-Rosen D (2008) Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science* 321(5895):1493–1495. doi: 10.1126/science.1158554
- Chen GY, Nuñez G (2010) Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* 10(12):826–837. doi: 10.1038/nri2873
- Cubedo J, Padró T, Badimon L (2013) Coordinated proteomic signature changes in immune response and complement proteins in acute myocardial infarction: The implication of serum amyloid P-component. *International Journal of Cardiology* 168(6):5196–5204. doi: 10.1016/j.ijcard.2013.07.181
- Davies MJ (2000) CORONARY DISEASE: The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart* 83(3):361–366. doi: 10.1136/heart.83.3.361
- Deckers JW (2013) Classification of myocardial infarction and unstable angina: A reassessment. *International Journal of Cardiology* 167(6):2387–2390. doi: 10.1016/j.ijcard.2013.01.008
- Eckert RE, Neuder LE, Park J, Adler KB, Jones SL (2010) Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) protein regulation of human neutrophil migration. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 42(5):586–594. doi: 10.1165/rcmb.2008-0394OC
- Eden E, Navon R, Steinfeld I, Lipson D, Yakhini Z (2009) GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics* 10:48. doi: 10.1186/1471-2105-10-48
- Fournier BM, Parkos CA (2012) The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol* 5(4):354–366. doi: 10.1038/mi.2012.24
- Gu C, Liu M, Zhao T, Zhai L, Wang Y (2015) Recombinant Human Annexin A5 Can Repair the Disrupted Cardiomyocyte Adherens Junctions in Endotoxemia. *Shock* 44(1):83–89. doi: 10.1097/SHK.0000000000000370
- Herold G (2011) Innere Medizin: Eine vorlesungsorientierte Darstellung. Herold, Gerd
- Hoffmann J (2013) Telomere Length in Different Subpopulations of Peripheral Blood Leukocytes in Patients with Coronary Heart Disease: Dissertation
- Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, Fitzgerald KA, Latz E (2008) Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat. Immunol.* 9(8):847–856. doi: 10.1038/ni.1631
- Ingle E, Hemmings BA (1994) Pleckstrin homology (PH) domains in signal transduction. *J. Cell. Biochem.* 56(4):436–443. doi: 10.1002/jcb.240560403

- Karow T, Lang-Roth R (2015) *Pharmakologie und Toxikologie: Vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden für Studium und Praxis*, 23rd edn.
- Kennedy AD, DeLeo FR (2009) Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunol Res* 43(1-3):25–61. doi: 10.1007/s12026-008-8049-6
- Kolaczowska E, Kubes P (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 13(3):159–175. doi: 10.1038/nri3399
- Lang F, Aravamudhan S, Nolte H, Türk C, Hölper S, Müller S, Günther S, Blaauw B, Braun T, Krüger M (2017) Dynamic changes in the mouse skeletal muscle proteome during denervation-induced atrophy. *Dis Model Mech* 10(7):881–896. doi: 10.1242/dmm.028910
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7(9):678–689. doi: 10.1038/nri2156
- Liebetrau C, Hoffmann J, Dörr O, Gaede L, Blumenstein J, Biermann H, Pyttel L, Thiele P, Troidl C, Berkowitsch A, Rolf A, Voss S, Hamm CW, Nef H, Möllmann H (2015) Release kinetics of inflammatory biomarkers in a clinical model of acute myocardial infarction. *Circulation Research* 116(5):867–875. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.304653
- Liehn EA, Tuchscheerer N, Kanzler I, Drechsler M, Fraemohs L, Schuh A, Koenen RR, Zander S, Soehnlein O, Hristov M, Grigorescu G, Urs AO, Leabu M, Bucur I, Merx MW, Zerneck A, Ehling J, Gremse F, Lammers T, Kiessling F, Bernhagen J, Schöber A, Weber C (2011) Double-edged role of the CXCL12/CXCR4 axis in experimental myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 58(23):2415–2423. doi: 10.1016/j.jacc.2011.08.033
- Liu Y, Chen G-Y, Zheng P (2009) CD24-Siglec G/10 discriminates danger- from pathogen-associated molecular patterns. *Trends in Immunology* 30(12):557–561. doi: 10.1016/j.it.2009.09.006
- Liu B, Yang Y, Qiu Z, Staron M, Hong F, Li Y, Wu S, Li Y, Hao B, Bona R, Han D, Li Z (2010) Folding of Toll-like receptors by the HSP90 paralogue gp96 requires a substrate-specific cochaperone. *Nat Commun* 1:79. doi: 10.1038/ncomms1070
- LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193(1):265–275

- Luerman GC, Uriarte SM, Rane MJ, McLeish KR (2010) Application of proteomics to neutrophil biology. *Journal of Proteomics* 73(3):552–561. doi: 10.1016/j.jprot.2009.06.013
- Magrane M, Uniprot Consortium (2011) UniProt Knowledgebase: a hub of integrated protein data. *Database (Oxford)* 2011:bar009. doi: 10.1093/database/bar009
- McCracken JM, Allen L-AH (2014) Regulation of human neutrophil apoptosis and lifespan in health and disease. *J Cell Death* 7:15–23. doi: 10.4137/JCD.S11038
- McDonald B, Pittman K, Menezes GB, Hirota SA, Slaba I, Waterhouse, C. C. M., Beck PL, Muruve DA, Kubes P (2010) Intravascular Danger Signals Guide Neutrophils to Sites of Sterile Inflammation. *Science* 330(6002):362–366. doi: 10.1126/science.1195491
- McLeish KR, Merchant ML, Klein JB, Ward RA (2013) Technical note: proteomic approaches to fundamental questions about neutrophil biology. *Journal of Leukocyte Biology* 94(4):683–692. doi: 10.1189/jlb.1112591
- Mollinedo F, Martín-Martín B, Gajate C, Lazo PA (1998) Physiological activation of human neutrophils down-regulates CD53 cell surface antigen. *Journal of Leukocyte Biology* 63(6):699–706
- Montecucco F, Lenglet S, Braunersreuther V, Pelli G, Pellieux C, Montessuit C, Lerch R, Deruaz M, Proudfoot AE, Mach F (2010) Single administration of the CXC chemokine-binding protein Evasin-3 during ischemia prevents myocardial reperfusion injury in mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30(7):1371–1377. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.206011
- Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hébert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA (2000) International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.* 52(1):145–176
- Nakamura S-I, Yamamura H (2010) Yasutomi Nishizuka: father of protein kinase C. *J. Biochem.* 148(2):125–130. doi: 10.1093/jb/mvq066
- Olsen, Jesper V. et al (2009) A Dual Pressure Linear Ion Trap Orbitrap Instrument with Very High Sequencing Speed
- Phillipson M, Kubes P (2011) The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med* 17(11):1381–1390. doi: 10.1038/nm.2514
- Puolakkainen P, Koski A, Vainionpää S, Shen Z, Repo H, Kemppainen E, Mustonen H, Seppänen H (2014) Anti-inflammatory macrophages activate invasion in pancreatic

- adenocarcinoma by increasing the MMP9 and ADAM8 expression. *Med Oncol* 31(3):884. doi: 10.1007/s12032-014-0884-9
- Ramos-Mozo P, Madrigal-Matute J, Martinez-Pinna R, Blanco-Colio LM, Lopez JA, Camafeita E, Meilhac O, Michel J-B, Aparicio C, de Ceniga, M. V., Egido J, Martin-Ventura JL (2011) Proteomic Analysis of Polymorphonuclear Neutrophils Identifies Catalase as a Novel Biomarker of Abdominal Aortic Aneurysm: Potential Implication of Oxidative Stress in Abdominal Aortic Aneurysm Progression. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31(12):3011–3019. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.237537
- Rappsilber J, Ishihama Y, Mann M (2003) Stop and Go Extraction Tips for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, Nanoelectrospray, and LC/MS Sample Pretreatment in Proteomics. *Anal. Chem.* 75(3):663–670. doi: 10.1021/ac026117i
- Rehm H, Letzel T (2010) *Der Experimentator: Proteinbiochemie, Proteomics*, 6. Aufl. Der Experimentator. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg
- Shevchenko A, Tomas H, Havli J, Olsen JV, Mann M (2007) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 1(6):2856–2860. doi: 10.1038/nprot.2006.468
- Soehnlein O (2012) Multiple Roles for Neutrophils in Atherosclerosis. *Circulation Research* 110(6):875–888. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.257535
- Squier MK, Sehnert AJ, Sellins KS, Malkinson AM, Takano E, Cohen JJ (1999) Calpain and calpastatin regulate neutrophil apoptosis. *J. Cell. Physiol.* 178(3):311–319. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(199903)178:3<311:AID-JCP5>3.0.CO;2-T
- Statistisches Bundesamt (2015) *Die 10 häufigsten Todesursachen*
- Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER (2010) Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in Immunology* 31(8):318–324. doi: 10.1016/j.it.2010.05.006
- Szigeti A, Bellyei S, Gasz B, Boronkai A, Hocsak E, Minik O, Bognar Z, Varbiro G, Sumegi B, Gallyas F (2006) Induction of necrotic cell death and mitochondrial permeabilization by heme binding protein 2/SOUL. *FEBS Lett.* 580(27):6447–6454. doi: 10.1016/j.febslet.2006.10.067
- Tomazella GG, da Silva I, Laure HJ, Rosa JC, Chammas R, Wiker HG, de Souza, Gustavo A, Greene LJ (2009) Proteomic analysis of total cellular proteins of human neutrophils. *Proteome Sci* 7:32. doi: 10.1186/1477-5956-7-32

- Van de Werf, F., Bax J, Betriu A, Blomstrom-Lundqvist C, Crea F, Falk V, Filippatos G, Fox K, Huber K, Kastrati A, Rosengren A, Steg PG, Tubaro M, Verheugt F, Weidinger F, Weis M, Vahanian A, Camm J, Caterina R de, Dean V, Dickstein K, Funck-Brentano C, Hellemans I, Kristensen SD, McGregor K, Sechtem U, Silber S, Tendera M, Widimsky P, Zamorano JL, Aguirre FV, Al-Attar N, Alegria E, Andreotti F, Benzer W, Breithardt O, Danchin N, Mario CD, Dudek D, Gulba D, Halvorsen S, Kaufmann P, Kornowski R, Lip, G. Y. H., Rutten F (2008) Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: The Task Force on the management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology. *European Heart Journal* 29(23):2909–2945. doi: 10.1093/eurheartj/ehn416
- Wakana Y, Koyama S, Nakajima K-i, Hatsuzawa K, Nagahama M, Tani K, Hauri H-P, Melançon P, Tagaya M (2005) Reticulon 3 is involved in membrane trafficking between the endoplasmic reticulum and Golgi. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334(4):1198–1205. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.07.012
- Weiß C (2013) *Basiswissen Medizinische Statistik*, 6., überarbeitete Auflage. Springer-Lehrbuch. Imprint: Springer, Berlin, Heidelberg
- Wenzel P, Schulz E, Gori T, Ostad MA, Mathner F, Schildknecht S, Gobel S, Oelze M, Stalleicken D, Warnholtz A, Munzel T, Daiber A (2009) Monitoring White Blood Cell Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase Activity: Implications for Nitrate Therapy in Humans. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 330(1):63–71. doi: 10.1124/jpet.108.149716
- Yan X, Anzai A, Katsumata Y, Matsushashi T, Ito K, Endo J, Yamamoto T, Takeshima A, Shinmura K, Shen W, Fukuda K, Sano M (2013) Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 62:24–35. doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.04.023
- Ye RD, Boulay F, Wang JM, Dahlgren C, Gerard C, Parmentier M, Serhan CN, Murphy PM (2009) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family. *Pharmacol. Rev.* 61(2):119–161. doi: 10.1124/pr.109.001578
- Yuan X, Kuramitsu Y, Furumoto H, Zhang X, Hayashi E, Fujimoto M, Nakamura K (2007) Nuclear protein profiling of Jurkat cells during heat stress-induced apoptosis by 2-DE and MS/MS. *Electrophoresis* 28(12):2018–2026. doi: 10.1002/elps.200600821

- Zhang Q, Raoof M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, Brohi K, Itagaki K, Hauser CJ (2010) Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 464(7285):104–107. doi: 10.1038/nature08780
- Zhou J-Y, Krovvidi RK, Gao Y, Gao H, Petritis BO, De AK, Miller-Graziano CL, Bankey PE, Petyuk VA, Nicora CD, Clauss TR, Moore RJ, Shi T, Brown JN, Kaushal A, Xiao W, Davis RW, Maier RV, Tompkins RG, Qian W-J, Camp DG, Smith RD (2013) Trauma-associated human neutrophil alterations revealed by comparative proteomics profiling. *Prot. Clin. Appl.* 7(7-8):571–583. doi: 10.1002/prca.201200109

12 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Joost Bernd Efken

13 Danksagungen

Zunächst möchte ich Herrn PD Dr. phil. nat. Christian Troidl für die Betreuung dieser Arbeit danken. Bei ihm konnte ich mir stets Anregungen abholen – sowohl bei theoretischen Fragestellungen als auch bei Problemen praktischer Natur im Rahmen der Labor-tätigkeit. Ich danke zudem Herrn Dr. med. Jędrzej Hoffmann für seine Unterstützung bei dieser Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Marcus Krüger und seinem Team (dabei insbesondere Frau Sylvia Jeratsch und Frau Soraya Hölper) für die Betreuung und die vielen Ratschläge hinsichtlich der massenspektrometrischen Messungen, sowie deren technischer Durchführung.

Ich danke dem Team der Arbeitsgruppe Experimentelle Kardiologie des Franz-Groedel-Institutes in Bad Nauheim für die gute und erfrischende Zusammenarbeit im Labor, sowie für erholsame und gesprächige Mittagspausen.

Des Weiteren danke ich meinen Eltern Elke und Josef Efken, die mich in meinen Vorhaben gefördert haben und ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke meiner Lebensgefährtin, Jana Grefe, dafür dass sie stets ein offenes Ohr für mich hatte und mir in schwierigen Momenten zur Seite stand.

Zudem danke ich meinem Freund und Mitdoktoranden, David Kost, für die gute und schöne Zusammenarbeit im Labor, sowie für viele gemeinsame Zugfahrten, Mittagspausen und Abende.

Zuletzt danke ich meinen Kindern Lotta und Janosch dafür dass sie mich jeden Tag aufs Neue erfreuen und mein Leben bereichern. Ihnen widme ich diese Arbeit.